

Université de Sherbrooke

**Amélioration d'une méthode de caractérisation du simple-brin télomérique
de *Saccharomyces cerevisiae* et analyse de l'expression génique en absence
du capuchon télomérique**

Par

Christian Prud'homme

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé

En vue de l'obtention de grade de

Maître ès Science (M.Sc.) en microbiologie

Mai 2008



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-49570-4

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-49570-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Table des matières.....	I
Listes des illustrations.....	III
Liste des abréviations.....	V
Résumé.....	IX
Introduction.....	1
La découverte et l'étude des télomères.....	1
Les télomères.....	2
L'ADN télomérique de la levure.....	3
La structure nucléoprotéique des télomères.....	5
La protection des télomères.....	8
La télomérase.....	11
La télomérase de la levure.....	13
La régulation de la taille des télomères.....	19
La génération du simple-brin télomérique.....	21
La maintenance des télomères en absence de la télomérase.....	24
Les survivants indépendants de la télomérase et du capuchon télomérique.....	27
Le phénomène d'adaptation aux signaux des points de contrôle en présence d'une cassure double-brin.....	29
Objectifs principaux.....	30
Chapitre 1 : Étude du simple-brin télomérique : Optimisation d'une technique ..	31
Préambule.....	31
Objectif spécifique.....	31
Matériel et méthodes.....	32
Culture de bactéries.....	32
Culture de levures.....	32
Manipulation d'acide nucléique.....	33
Souches.....	33
Purification d'ADN génomique de levure.....	34
Quantification d'acide nucléique.....	35
Radio marquage d'oligonucléotide par transfert de phosphate.....	35
Radio marquage par extension d'amorce.....	36
Technique d'extension d'amorce modifiée.....	36
A) Enrichissement des fragments de restrictions terminaux (TRF).....	36
B) Quantification des TRF purifiés.....	37
C) Ajout de la queue poly-A.....	38
D) Appariement de l'amorce poly-T.....	38
E) Extension de l'amorce.....	39
Traitement à l'Exonucléase I.....	40
Traitement à la nucléase Mung Bean.....	41
Purification des TRF par chromatographie d'exclusion.	41
A) Détermination de la résolution de la purification pour des fragments d'ADN	
B) Purification des TRF de YLpFAT10 par chromatographie d'exclusion	
Gel de télomère.....	43
Hybridation dans le gel « in gel ».....	43

Résultats.....	45
Optimisation de l'appariement et de l'extension d'amorce.....	47
Optimisation de la polyadénylation avec la terminale deoxynucléotidyle transférase (TdT)	54
Essai des conditions optimisées pour la réaction d'extension d'amorce.....	61
Essai de purification des TRF par chromatographie d'exclusion diffusion.....	66
Chapitre 2 Étude des modifications d'expression génique suite à la perte du gène essentiel <i>CDC13</i>	73
Préambule.....	73
Objectif spécifique.....	73
Matériel et méthodes.....	74
Transformation de levure.....	74
Souches.....	75
Plasmides.....	75
Extraction d'ARN total.....	77
Buardage de type Northern.....	77
Buardage de type Southern.....	78
Croissance par dilution en série (spot tests)	78
Analyse transcriptionnelle par puce à ADN (microarray).....	79
Génération de survivants indépendants de la télomérase.....	80
Génération de survivants qui vivent et prolifèrent en absence de Cdc13p.....	81
Détermination de la fréquence d'apparition de cellules capable de survivre en absence de Cdc13p.....	82
Test de fluctuation	83
Résultats.....	84
Caractérisation et vérification des souches à utiliser.....	85
Expérience d'analyse de l'expression génique par micropuce.....	88
Évaluation des résultats de l'hybridation sur micropuce.....	89
Confirmation et validation des résultats par hybridation de type Northern.....	92
Analyse de l'effet de la présence de <i>DNL4</i> , <i>MMS2</i> et <i>HUG1</i> en plusieurs copies sur la fréquence et le taux d'adaptation à la perte de Cdc13p.....	100
Discussion et conclusions	106
Étude du simple-brin télomérique : Optimisation d'une technique	106
Étude des modifications d'expression génique suite à la perte du gène essentiel <i>CDC13</i>	113
Remerciements	122
Liste de références	123

Liste des figures

Tableau 1 :	Organisation de l'ADN télomérique chez différentes espèces.....	3
Figure 1 :	Télomères de la levure.....	5
Figure 2 :	Organisation nucléoprotéique des télomères.....	7
Figure 3 :	Action de la télomérase.....	13
Figure 4 :	Organisation télomérique dans le cycle cellulaire.....	16
Figure 5:	L'holoenzyme de la télomérase dans la levure et chez l'humain.....	18
Figure 6:	Génération de survivant indépendant de la télomérase par deux voies.....	26
Figure 7:	Schématisation de la technique d'extension d'amorce modifiée pour mesurer le simple-brin télomérique.....	40
Figure 8 :	Plasmide linéaire YLpFAT10.....	43
Tableau 2:	Séquence des oligonucléotides utilisés dans l'essai d'extension d'amorce modifiée.....	44
Figure 9:	Exemples de résultats concluants de la technique d'extension d'amorce modifiée original.....	46
Figure 10 :	Résultats d'optimisation de l'extension d'amorce.....	49
Figure 11 :	Optimisation de la température d'appariement et d'extension.....	53
Tableaux 3:	Détermination de l'amorce et des conditions d'extension qui favorise les produits d'extension.....	54
Figure 12 :	Vérification de l'efficacité de la polyadénylation sur un substrat oligonucléotide et sur TRF purifiés.....	56
Figure 13 :	Vérification de la spécificité de la TdT.....	58
Figure 14:	Efficacité de la polyadénylation avec la TdT recombinante.....	60
Figure 15:	Extension d'amorce modifiée utilisant la TdT recombinante sur oligonucléotides et TRF purifiés.....	63
Figure 16:	Extension d'amorce modifiée sur oligonucléotides ou TRF purifiés, traités ou non à l'Exonucléase I ou la nucléase Mung-Bean.....	65
Figure 17:	Chromatographie d'exclusion sur un marqueur d'ADN.....	67

Figure 18:	Purification de TRF plasmidiques d'une souche <i>mre11Δ</i> par chromatographie d'exclusion.....	70
Figure 19:	Résultat de la technique d'extension d'amorce modifiée sur TRF plasmidiques purifiés par chromatographie.....	72
Figure 20 :	Procédé utilisé pour l'expérience d'hybridation sur puce à ADN.....	79
Figure 21 :	Génération de cellules indépendantes de Cdc13p à partir de survivants de type I et de type II.....	82
Figure 22 :	Génération de souches à utiliser pour l'analyse de l'expression génique.....	84
Figure 23:	Analyse des télomères des souches $\Delta 13$ avec <i>TLC1</i> et <i>CDC13</i> réintroduit.....	86
Figure 24:	Analyse de la sensibilité aux dommages à l'ADN des souches $\Delta 13$ lorsque <i>TLC1</i> et <i>CDC13</i> sont réintroduit.....	88
Figure 25:	Graphique comparatif des signaux moyens pour les cellules avec ou sans <i>CDC13</i>	89
Tableau 4 :	Liste des gènes d'intérêts dont l'expression est modifiée en absence de Cdc13p.....	92
Figure 26:	Vérification de l'expression de l'ARN de <i>CDC13</i>	93
Figure 27:	Analyse de l'expression de <i>DNL4</i>	95
Figure 28 :	Analyse de l'expression de <i>PTP2</i>	96
Figure 29 :	Analyse de l'expression de <i>MMS2</i>	97
Figure 30 :	Analyse de l'expression de <i>HUG1</i>	100
Figure 31 :	Analyse de l'expression de <i>HUG1</i> dans les cellules $\Delta 13$ ou suite à des dommages à l'ADN.....	100
Figure 32 :	Surexpression du gène <i>MMS2</i> dans des survivants sans <i>TLC1</i>	101
Figure 33 :	Fréquence relative d'apparition de cellules capable de survivre en absence de Cdc13p.....	103
Figure 34 :	Taux d'adaptation à la perte de Cdc13p selon les gènes présents en plusieurs copies.....	105
Figure 35 :	Taux d'adapatation à la perte de Cdc13p en fonction de l'expression de <i>MMS2</i>	106

Liste des abréviations

°C	Degré Celcius
A	Adénine
ADN	acide deoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
cm	centimètre (10^{-2} mètre)
C	Cytosine
dATP	désoxy adénine tri-phosphate
db	double-brin
dCTP	désoxy cytosine tri-phosphate
DEPC	diéthylpyrocarbonate
dGTP	désoxy guanine tri-phosphate
DO ₆₆₀	Densité optique à 660nm
dTTP	thymine tri-phosphate
EDTA	acide éthylène diamine tetraacétique
FPLC	« Fast Protein Liquid Chromatography »
FOA	Acide <u>5-Fluoroorotique</u>
g	gramme
x g	force de gravitation de la terre

G	Guanine
h	heure
kb	Kilo paires de base (1000 paires de base)
LB	Milieu « Luria Broth » (0.5% Yeast Extract, 1% Tryptone, 1% NaCl)
LETS	(0,1M chlorure de lithium, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% SDS)
LiAc	acétate de lithium
M	molaire (1mole/litre de solution)
min.	minute
mm	millimètre (10^{-3} mètre)
MMS	Methyle méthanesulfonate
MOPS	acide 3-morpholinopropane-1-sulfonique
NaCl	chlorure de sodium
ng	nanogramme (10^{-9} gramme)
NHEJ	Jonction de bouts non-homologue « non-homologous end-joining »
NIB	tampon d'extraction nucléaire (nuclear extraction buffer)

nt	Nucléotides
ORF	open reading frame
pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérase en chaîne (polymerase chain reaction)
PEG 4000	polyethylene glycol 4000
pH	Unité de mesure de la concentration d'ions H ⁺ , ou d'acidité
pmol	picomole (10 ⁻¹² mole)
sb	simple-brin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec.	Seconde
Solution Denharts	50x 1% Ficoll (type 400), 1% polyvinylpyrrolidone, and 1% albumine bovine
SSC	Sodium chloride Sodium citrate 1x (NaCl 150mM, citrate de sodium 15mM)
ssDNA	ADN simple-brin
T	Thymine
TAE	Tampon Tris acetate EDTA (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM)
TBE	Tampon Tris-borate-EDTA (Tris-borate 40mM, EDTA 1mM)

TdT	Terminal deoxynucéotidyle transférase
TE	Tris-EDTA (Tris 10mM, 1mM EDTA pH 8.0)
TRF	Fragments de restriction terminaux (terminal restriction fragments)
U	Uracile
μM	micromolaire
μg	microgramme (10^{-6} gramme)
YEPD	Milieu « Yeast extract peptone dextrose », 1% yeast extract, 2%peptone, 2% agar, 0.01% Adénine
Yc	Milieu complet synthétique (Yeast synthetic complete)

Université de Sherbrooke

**Amélioration d'une méthode de caractérisation du simple-brin
télomérique de *Saccharomyces cerevisiae* et analyse de l'expression
génique en absence du capuchon télomérique**

Christian Prud'homme

Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé en vue de
l'obtention de grade de Maître ès Science (M.Sc.) en microbiologie

Mai 2008

Mots-clefs : Télomère, télomérase, levure, extension simple-brin, adaptation.

Résumé

Les structures d'ADN terminales des chromosomes eucaryotes, ainsi que les protéines qui y sont associées, sont cruciales pour le maintien de l'intégrité du génome. Ces structures nucléoprotéiques se nomment télomères et ils sont responsables de la protection et de la réplication des extrémités des chromosomes. L'ADN des télomères est constituée de séquences répétées qui sont maintenues grâce à la télomérase. Chez toutes les espèces étudiées, le brin G-riche de l'ADN des télomères est plus long et forme une extension simple-brin. Cette structure particulière est importante pour le maintien des télomères par la télomérase et pour leur fonction de protection contre la dégradation. Peu de choses sont connues

sur les mécanismes responsables de la génération de ce simple-brin et l'étude du simple-brin de la levure *S.cerevisiae* pourrait nous donner des informations importantes. Nous avons donc tenté d'optimiser une technique biochimique permettant de mesurer le simple-brin télomérique. Finalement, cette technique peut nous permettre de mesurer l'extension télomérique mais elle demeure difficile et impossible à utiliser de façon routinière.

Nous avons également étudié des souches de levures particulières qui parviennent à survivre sans télomérase et sans la protéine Cdc13p. Celle-ci lie le simple-brin télomérique et est responsable de la protection des télomères ; donc elle est normalement essentielle à la survie des cellules. Nous avons étudié les différences d'expression génique dans les souches sans Cdc13p par analyse de micropuce afin d'identifier les gènes importants pour ce phénomène d'adaptation à la perte du capuchon télomérique. Finalement, dans le contexte de l'étude, nous n'avons pas observé d'impact majeur de la perte de Cdc13p sur l'expression global. Nous n'avons pas été en mesure d'identifier des gènes importants pour l'adaptation à la perte du capuchon télomérique.

Introduction

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont pu progresser en étant capables de répliquer et de protéger leurs codes génétiques. La capacité à maintenir l'information génétique est une caractéristique essentielle à l'apparition de la vie et à l'évolution. Au fur et à mesure que les organismes ont évolué, l'information génétique à maintenir n'a cessé d'augmenter et les stratégies utilisées pour maintenir cette information se sont complexifiées. D'abord, les procaryotes sont parvenus à maintenir leurs génomes en utilisant principalement l'ADN circulaire, et ensuite les chromosomes des cellules se sont linéarisés. La linéarisation des chromosomes a engendré plusieurs problèmes de réplication et de protection des chromosomes. La solution à tous ces problèmes a été d'utiliser une structure permettant de répliquer et de protéger les chromosomes linéaires : les télomères.

La découverte et l'étude des télomères.

L'extrémité des chromosomes eucaryotes a d'abord été définie comme une région particulière suite à l'observation que la délétion des fragments terminaux était létale chez *Drosophila* (Muller, 1938). Les chercheurs ont conclu que les régions terminales étaient essentielles. De plus, dans les cellules de maïs, les télomères sont résistants aux événements de fusion qui peuvent survenir lors d'une cassure ailleurs sur les chromosomes. Cette expérience a permis d'affirmer que les télomères étaient différents du reste des chromosomes. Depuis la découverte de la double hélice d'ADN, de la réplication de l'ADN et des problèmes que posent la réplication des chromosomes linéaires (end-replication problem)(Olovnikov, 1971; Watson, 1972), l'intérêt concernant les télomères n'a cessé de s'intensifier. Les séquences télomériques ont d'abord été identifiées sur les mini-chromosomes contenant les gènes

des ARN ribosomiaux du cilié *Tetrahymena thermophila*, comme étant une région de séquences répétées, riche en thymine et guanine (Blackburn et Gall, 1978). Ensuite, les télomères de plusieurs organismes modèles ont été étudiés, notamment les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Candida albicans*, de la mouche à fruits *Drosophila melanogaster* et finalement des mammifères, en utilisant des cellules en cultures ou des souris. Les télomères de tous ces organismes possèdent les mêmes fonctions principales. Ils permettent la réplication complète des chromosomes linéaires et les protègent des événements de fusion et de dégradation. Les télomères sont des structures nucléoprotéiques essentielles pour prévenir l'instabilité génomique qui peut causer, chez les organismes multicellulaires, le développement de cancer.

Les télomères

Les télomères sont des structures conservées, ils sont constitués d'une séquence d'ADN particulière aux extrémités des chromosomes linéaires. À partir de ces séquences, il y a un assemblage de protéines qui forme une structure qui permet la protection et la réplication des chromosomes. Les séquences télomériques sont riches en guanine et thymine pour toutes les espèces où ces séquences ont été étudiées, mais les répétitions divergent d'une espèce à l'autre (Henderson, 1995) (Tableau 1). Ainsi, chez les humains et la plupart des vertébrés, la séquence répétée est TTAGGG et il existe différentes variations de cette séquence chez les organismes inférieurs. Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* les répétitions télomériques sont dégénérées c'est-à-dire qu'il y a de la variation dans la séquence à l'intérieur des répétitions. La longueur des télomères est très variable selon les espèces, allant de quelques nucléotides jusqu'à des dizaines, voir une centaine, de kb (Tableau 1).

Organisme	Séquence répétée 5'→ 3'	Longueur des répétitions	Longueur du simple-brin télomérique
Protozoaire			
<i>Tetrahymena</i>	T ₂ G ₄	250-300 pb	14-15 b
<i>Oxytricha</i>	T ₂ G ₄	20 pb (macronucleus)	16 b
<i>Euplote</i>	T ₂ G ₄	3-20 kb (micronucleus)	N-D
<i>Trypanosoma</i>	T ₂ AG ₃	28pb 10-20kb	14 b ~75-225 b
Fungi			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(TG ₃) ₁₋₆ TG ₂₋₃	~ 300 pb	12-14 b
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	T ₁₋₂ ACA ₀₋₁ C ₀₋₁ G ₁₋₄	~ 300 pb	N-D
Plantes			
<i>Arabidopsis</i>	T ₃ AG ₃	2-4,5 kb	20-30 b
Vertébrés			
<i>Homo sapiens</i>	T ₂ AG ₃	2-20 kb	~75-225 b
Plusieurs autres	T ₂ AG ₃	2-100 kb	~75-225 b

Tableau 1 : Organisation de l'ADN télomérique chez différentes espèces

Inspiré de (LeBel et Wellinger, 2005)

L'ADN télomérique de la levure

Les télomères de *S. cerevisiae* sont constitués d'environ 300pb de répétitions TG₁₋₃ dont le brin G-riche est plus long que le brin C-riche ce qui produit une extension simple-brin. Cette extension a d'abord été identifiée en fin de phase S puisque durant cette période, elle mesure plus de 25nt (Wellinger et al., 1993b) et ensuite elle a été observée durant tout le cycle cellulaire mesurant 12-14nt (Larrivee et al., 2004). Il a également été démontré que cette structure simple-brin est présente et est essentiel aux télomères de différentes espèces (Henderson et Blackburn, 1989). Une des particularités de l'extension G-riche télomérique est qu'elle est présente aux deux extrémités du même chromosome (Dionne et Wellinger, 1996), contrairement à ce qui est prédit par la répllication directionnelle des chromosomes et la dégradation de la dernière amorce d'ARN en 5' qui devrait générer une extrémité 3' saillante et une

extrémité franche. Or l'extension 3' télomérique est présente aux deux extrémités des chromosomes et semble être le résultat d'une dégradation du brin C-riche (Lingner et al., 1995; Wellinger et al., 1996). Les mécanismes de régulation, de même que les nucléases responsables de cette dégradation sont grandement inconnus (Wellinger et al., 1996). Contrairement au simple-brin d'autres organismes, il semble que chez la levure, la longueur est hétérogène et que les nucléotides terminaux sont dégénérés (Forstemann et al., 2000; Henderson et Blackburn, 1989; Jacob et al., 2001). L'extrémité simple-brin télomérique est également présente chez les cellules humaines et il est plus long que celui de la levure (75-225pb). Il a également été démontré que l'extension G-riche télomérique était d'une longueur différente aux deux extrémités des chromosomes et donc qu'il y a deux mécanismes différents pour la création du simple-brin selon que l'extrémité est répliquée par la machinerie du brin avancé ou retardé (Chai et al., 2006a).

Les télomères contiennent également une région sous-télomérique (Figure 1) qui englobe, chez la levure, des éléments X et Y (Chan et Tye, 1983a; Chan et Tye, 1983b; Louis et Haber, 1992; Walmsley et al., 1984). Peu d'information est disponible sur les séquences répétées X et il est toujours inconnu si elles possèdent des fonctions particulières. Les éléments Y' sont des séquences répétées polymorphiques qui sont généralement présentes en 2 versions, Y'-S et Y'-L selon leur longueur. Les séquences Y' encodent également pour une hélicase, Y'-hlp1, qui serait induite dans certaines conditions de croissances en absence de télomérase. Les éléments Y sont présents sur 2/3 des télomères de 1 à 4 fois et ces éléments sont entrecoupés de répétitions télomériques. Le site d'enzyme de restriction *XhoI* présent dans les éléments Y' permet de créer, en digérant avec cette enzyme, des fragments de restriction terminaux (« terminal restriction fragments », TRF) qui sont utilisés pour

évaluer la taille des répétitions télomériques chez la levure. Dans une souche de type sauvage (WT) dont l'ADN est digéré avec XhoI un TRF d'approximativement 1,2kb sera libéré, représentant 900pb de la séquence Y' et environ 300pb de répétitions télomériques. Pour des souches mutantes qui ont des déficiences dans le maintien de leurs télomères, la taille de ces TRF peut diminuer à 1kb lorsque la taille des répétitions diminue et pour d'autres mutants, dont les télomères rallongent, ces TRF augmentent par rapport à ceux dérivés des cellules WT.

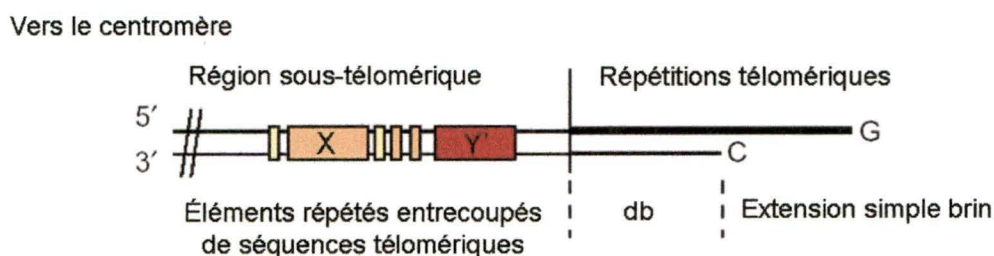


Figure 1 : Télomères de la levure

Environ 2/3 des télomères contiennent de 1 à 4 éléments Y', entrecoupés de 50-100 pb de répétition télomériques. La région sous-télomérique contient également des éléments X. Les répétitions télomériques sont d'environ 300pb pour des levures WT et raccourcis à environ 50pb lorsque les télomères sont courts. L'extension simple brin G-riche est présente aux deux extrémités des chromosomes.

La structure nucléoprotéique des télomères

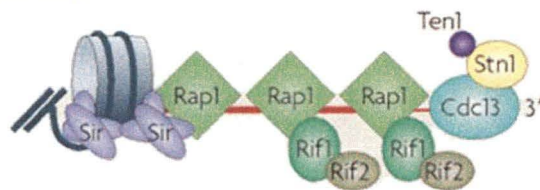
Aux télomères s'associe une multitude de protéines essentielles à l'accomplissement des fonctions télomériques. Plusieurs protéines ont d'abord été caractérisées chez la levure *S. cerevisiae* et des homologues ou des orthologues de ces protéines ont ensuite été trouvés chez d'autres organismes comme les mammifères. Dans bien des cas, il existe des protéines aux fonctions similaires chez la levure et chez l'humain, ce qui rend intéressantes les études sur la levure même s'il y a aussi certaines différences importantes (Figure 2).

D'abord, l'ADN double-brin télomérique de la levure est empaqueté dans un complexe ADN-protéine particulier qui diffère du restant de l'ADN, (Wright et al., 1992). Les répétitions sont liées par une multitude de protéines Rap1p qui interagissent, soit avec les protéines Sir ou avec le complexe Rif, ces complexes qui sont reconnus pour contrôler négativement l'élongation des télomères (Marcand et al., 1996; Marcand et al., 1997b; Wotton et Shore, 1997). La fonction de protection des télomères est principalement attribuée à la protéine Cdc13p (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996) qui lie le simple-brin télomérique via son domaine « OB-fold » (Mitton-Fry et al., 2002). Cdc13p possède également des interactions avec d'autres protéines essentielles, Stn1p et Ten1p, formant le capuchon télomérique (Gao et al., 2007; Grandin et al., 2001) (Figure 2).

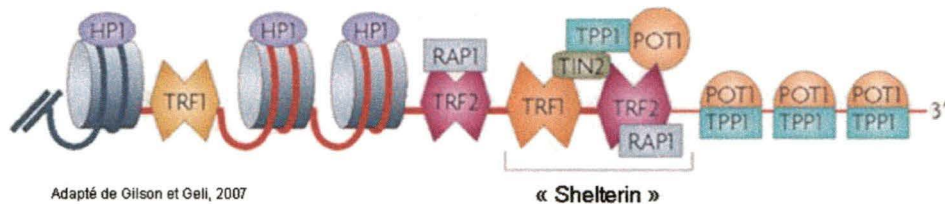
Dans les cellules humaines, la protection des télomères est assurée principalement par la protéine POT1 qui, comme Cdc13p, couvre le simple-brin télomérique qui est sensiblement plus long que celui de la levure et est présent durant tout le cycle cellulaire (Makarov et al., 1997; McElligott et Wellinger, 1997; Wright et al., 1997). POT1 interagit également avec la protéine TPP1 (Hockemeyer et al., 2007; O'Connor et al., 2006). Ces protéines forment le complexe appelé « Shelterin » qui englobe également les protéines TRF1, TRF2, RAP1 et TIN2 (de Lange, 2005; Ye et al., 2004a; Ye et al., 2004b). Le complexe « Shelterin » permet de cacher les télomères des mécanismes de réparation des cassures double-brin et prévient l'activation des points de contrôles, il empêche également les fusions entre télomères et inhibe la recombinaison homologue (van Steensel et al., 1998; Wang et al., 2004). Lorsque les séquences télomériques ne sont pas liées par ce complexe, elles sont empaquetées comme le reste de la chromatine, avec des nucléosomes et la protéine HP1, formant une structure d'hétérochromatine (Makarov et al., 1993; Tommerup et

al., 1994) (Figure 2). Les télomères de mammifères et d'autres organismes (Cesare et al., 2007; Munoz-Jordan et al., 2001), adoptent une structure secondaire particulière qui apparaît comme étant très importante pour réguler l'homéostasie de la longueur des télomères. Cette structure, découverte par microscopie électronique, a été appelée « t-loop » (Griffith et al., 1999), elle serait créée suite à l'envahissement du simple-brin télomérique à l'intérieur des répétitions internes pour créer un duplex (« D-loop ») ce qui forme une grande boucle à l'extrémité des chromosomes. La formation de ces boucles serait facilitée par des protéines qui lient l'ADN télomérique comme TRF2 (Stansel et al., 2001) et les autres constituants du complexe « Shelterin ». Cette structure permettrait de protéger l'extrémité télomérique en plus de permettre de contrôler la longueur des télomères via la modulation de l'accessibilité des télomères à la télomérase.

S.cerevisiae



Mammifères



Adapté de Gilson et Gell, 2007

Figure 2 : Organisation nucléoprotéique des télomères.

Les lignes épaisses bleu ou rouge représentent le duplex d'ADN, en rouge ce sont les séquences télomériques. Les lignes rouges plus minces représentent le simple-brin télomérique. La longueur des duplex d'ADN ainsi que la taille des protéines schématisée n'est pas à l'échelle. Les gros cylindres bleus représentent les nucléosomes. Voir le texte pour une description détaillée.

La protection des télomères

Comme il a été mentionné dans la section sur la structure nucléoprotéique des télomères, la protection des télomères de *S. cerevisiae* est principalement assurée par la protéine Cdc13 en complexe avec Stn1p et Ten1p. Une multitude d'études ont utilisé la protéine Cdc13 et des allèles mutants pour comprendre la protection des télomères et comment ce capuchon télomérique parvient à cacher les extrémités des points de contrôles et des protéines impliquées dans le NHEJ ou la recombinaison homologue (HR) et ainsi éviter de créer de l'instabilité génomique. D'abord, le gène *CDC13* a été identifié comme étant impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Cell Division Cycle). Effectivement, les cellules *cdc13-1* arrêtent en phase G2/M (Garvik et al., 1995) et sont incapables d'effectuer le cycle cellulaire. Plus tard, la protéine a été caractérisée comme liant le simple-brin télomérique (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996). En fait, une molécule de Cdc13p peut lier *in vitro* une séquence minimale de 11 nts, constituée de G et de T via son domaine de liaison à l'ADN (« DNA binding domain » dbd) (Hughes et al., 2000b). En utilisant l'allèle *cdc13-1^{ts}* dont les fonctions de protection sont abolies à température restrictive ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), le rôle de cette protéine dans la protection des télomères a été confirmé. En utilisant cet allèle, plusieurs facteurs ont été identifiés comme étant impliqués dans la dégradation des télomères déprotégés ou dans la signalisation menant à l'activation des points de contrôle en cas de déprotection des télomères (Foster et al., 2006; Grandin et Charbonneau, 2007 ; Jia et al., 2004; Maringele et Lydall, 2002; Zubko et al., 2004). Les protéines Stn1p et Ten1p participent également à la protection des télomères (Figure 2)(Grandin et al., 2001). Notamment, il a été démontré qu'en surexprimant la protéine Ten1p et une portion de Stn1p ne liant pas Cdc13p mais qui lie Ten1p, il est possible à la cellule de se passer de la protéine essentiel Cdc13p

(Petreaca et al., 2006). Donc, dans certaines conditions, ces protéines peuvent assurer la protection des télomères en absence de Cdc13p. Il a ensuite été observé que Ten1 et Stn1 possèdent également une activité de liaison à l'ADN qui est spécifique pour les séquences télomériques, les auteurs de cette étude ont alors suggéré que les protéines Cdc13p-Ten1-Stn1p forment un complexe qui pourrait s'apparenter au complexe RPA mais dont les fonctions seraient spécifiques aux télomères (Gao et al., 2007). Toutefois, il a également été montré que la fonction de protection des télomères de Stn1p est indépendante de son interaction avec la protéine Cdc13p (Petreaca et al., 2007). Pour ce faire, la protéine Stn1p a été fragmentée en plusieurs portions qui possèdent ou non la capacité de lier Cdc13p ou Ten1p et ces fragments ont été exprimés à différents niveaux. L'analyse de ces différents allèles de STN1 a permis de conclure que la fonction essentielle de Stn1p est contenue dans sa portion n-terminale et que cette portion interagit avec Ten1p, mais pas avec Cdc13p. Finalement, il existe peut-être une redondance dans les interactions entre les protéines formant le capuchon télomérique.

Les protéines Yku70p et Yku80p, formant le complexe Ku, sont également impliquées dans la protection des télomères, elles protègent les télomères des activités nucléolytiques et des événements de recombinaison. Il a été observé que les mutants *kuΔ*, en plus d'avoir des télomères très courts et un simple-brin télomérique beaucoup plus long que les cellules WT, ils sont plus susceptibles aux événements de délétion rapide des télomères (« telomere rapid deletion » TRD) et à la recombinaison (Gravel et al., 1998; Polotnianka et al., 1998). De plus, les mutants *kuΔ* ont un phénotype de létalité synthétique avec les mutants de *CDC13* (*cdc13-1^{ts}* et *cdc13-2^{est4}*) ce qui peut s'expliquer soit parce que Ku est essentiel aux fonctions résiduelles des allèles de *CDC13* ou parce que l'absence de deux complexes aux fonctions partiellement

redondantes engendre des dommages à l'ADN (Bucholtz et al., 2001; Kyrion et al., 1992; Polotnianka et al., 1998).

Il existe plusieurs points communs entre les événements suivant la déprotection des télomères et l'apparition d'une cassure double-brin dans un chromosome (d'Adda di Fagagna et al., 2004). D'abord plusieurs protéines impliquées dans la réparation des cassures double-brin sont présentes aux télomères (exemple : le complexe MRX (Mre11p-Rad50p-Xrs2p), Tel1p et le complexe Ku). De plus, les télomères sans protection sont détectés par la cellule comme un dommage à l'ADN qui doit être réparé avant de poursuivre le cycle cellulaire (Garvik et al., 1995; Polotnianka et al., 1998). La « réparation » des télomères déprotégés par les machineries de NHEJ ou de recombinaison homologue cause des anomalies chromosomiques comme la fusion des extrémités de deux chromosomes, des bris de chromosomes suivis de fusion ou même la perte complète de chromosome. Ces anomalies sont très néfastes pour la cellule et peuvent causer des aneuploïdies (lorsqu'il y a un nombre anormal de chromosomes dans une cellule ou un organisme entier) ou des aberrations chromosomiques qui sont la marque des cellules cancéreuses chez les organismes multicellulaires. En utilisant principalement l'allèle *cdc13-1^{ts}*, certaines protéines ont été identifiées comme possédant une capacité à protéger les télomères déprotégés des souches possédant cet allèle. Les protéines Stn1, Ten1 et Ku ont déjà été mentionnées comme importantes pour la protection des télomères, mais à celles-ci il faut rajouter Mrc1p (Grandin et Charbonneau, 2007; Tsolou et Lydall, 2007). D'autres protéines, au contraire, sont partiellement responsables de la dégradation lors de la déprotection des télomères. Notamment, les protéines Exo1p, Rad24p participent à la dégradation aux télomères déprotégés (Zubko et al., 2004) et d'autres protéines limitent la

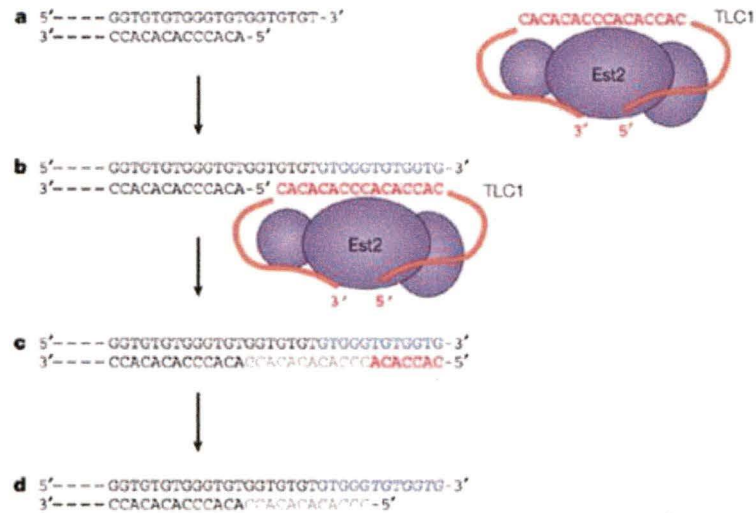
dégradation en contrôlant les points de contrôles comme Mec1p et Rad53p (Jia et al., 2004).

La télomérase

Les télomères permettent de résoudre le problème de réplication associée aux chromosomes linéaires. Étant donné que la réplication normale utilise des amorces d'ARN (8 à 12 nucléotides) et que ces amorces sont dégradées, l'extrémité 5' du brin nouvellement synthétisé manque la séquence correspondant à l'amorce d'ARN et cette séquence ne peut être récupérée. Cette érosion des télomères implique une durée de vie répllicative limitée ce qui veut dire qu'une cellule ne peut se diviser un nombre limité de fois, avant que ses télomères n'atteignent une longueur critique et ne soient plus capables d'empêcher l'instabilité génomique (Lundblad et Szostak, 1989). Or, tous les organismes unicellulaires eucaryotes ont une durée de vie répllicative illimitée et la majorité d'entre eux utilisent l'enzyme télomérase pour allonger leurs télomères. L'activité de la télomérase a d'abord été identifiée dans des extraits de *Tetrahymena thermophila*, en effet, des répétitions TTGGGG sont ajoutées sur un télomère synthétique en présence de ces extraits (Greider et Blackburn, 1985). Par la suite, cette activité a été identifiée chez d'autres organismes unicellulaires comme la levure *S. cerevisiae* (Lingner et al., 1997b). Il a ensuite été découvert qu'il existe également une télomérase chez l'humain (Morin, 1989). La télomérase utilise une matrice d'ARN pour allonger l'extrémité simple-brin 3' des répétitions G-riche (Figure 3) et la polymérisation du brin retardé peut se faire via la machinerie de réplication conventionnelle (Bailey et al., 2001; Parenteau et Wellinger, 1999). Étant donné la présence d'extension simple-brin aux deux extrémités des chromosomes qui sont due à des événements de dégradation peu connus, la télomérase peut agir sur les deux

extrémités 3' qu'il s'agisse de celle créée par la synthèse du brin retardé ou de la dégradation du brin C-riche (Makarov et al., 1997).

Les composantes de la télomérase ont été identifiées chez plus de 160 espèces eucaryotes (Podlevsky et al., 2007). Dans la plupart des cas, cette enzyme est active dans les cellules germinales, mais pas dans les cellules somatiques (Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Ces observations expliquent pourquoi il est difficile de cultiver des cellules humaines à partir de tissu (culture primaire), sans que celles-ci n'entrent en sénescence après un certain nombre de divisions. Pour cultiver ces cellules de façon continue, il est nécessaire qu'elles entrent dans un processus d'immortalisation qui passe souvent par une réactivation de la télomérase (Hayflick, 1965; Hayflick, 1984; Johnson et al., 1998). Ce phénomène d'immortalisation est également essentiel aux cellules cancéreuses pour qu'elles puissent se diviser un nombre infini de fois, contrairement aux cellules normales (Kim et al., 1994). La nécessité pour les cellules cancéreuses de maintenir leurs télomères rend l'étude de la télomérase intéressante puisque des médicaments contre le cancer pourraient être développés en ciblant la télomérase.



Adapté de Vega *et al.* 2003

Figure 3 : Action de la télomérase

a) Le simple-brin 3' G-riche est le substrat de la télomérase. L'activité catalytique est assurée par la protéine Est2p chez la levure correspondant à hTERT chez les humains. **b)** L'enzyme utilise la séquence matrice présente dans l'ARN (TLC1 pour la levure et hTR pour les cellules humaines) pour ajouter des nucléotides à l'extension simple-brin (en bleu). **c)** Suite à l'extension du brin G-riche par la télomérase, le brin C-riche est répliqué par la machinerie de réplication d'ADN conventionnelle (en gris). **d)** La dégradation du fragment d'Okazaki 5' (en rouge) laisse une extrémité 3' saillante du brin G-riche sans perte d'ADN initiale. Une seule ronde d'élongation par la télomérase est décrite, mais plusieurs rondes successives peuvent avoir lieu.

La télomérase de la levure.

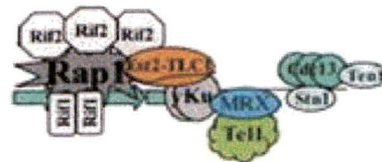
Chez la levure, les composants de la télomérase sont exprimés de façon constitutive et permettent aux cellules de maintenir l'ADN de leurs télomères et ainsi de se diviser par bourgeonnement virtuellement à l'infini. Par contre, il a été démontré que dans certains mutants on pouvait détecter le phénotype EST (« Ever Shorter Telomere ») qui implique un raccourcissement progressif des télomères au fil des générations, menant à un arrêt de croissance après 50-100 générations (Lendvay *et al.*, 1996; Lundblad et Szostak, 1989). En effectuant des études génétiques, 5 gènes ont été identifiés comme étant essentiels à l'activité de la télomérase *in vivo* soit *EST1*, *EST2*, *EST3*, *CDC13* et *TLC1*. À partir de ces informations et des études subséquentes, le rôle de la majorité de ces gènes a été déterminé. Le gène *TLC1* code pour un ARN qui

est la matrice à partir de laquelle les télomères sont allongés (Singer et Gottschling, 1994). La protéine Est2p est la sous-unité catalytique de la télomérase (Counter et al., 1997). Ces deux composants sont les seuls qui sont essentiels à l'activité *in vitro* de la télomérase (Counter et al., 1997; Lingner et al., 1997a). Il a été proposé que l'ARN de la télomérase, en plus d'être la matrice de cette enzyme, agit comme un échafaud qui grâce à sa structure secondaire particulière (Dandjinou et al., 2004), permet le recrutement de la télomérase aux télomères ainsi que plusieurs protéines nécessaires à l'activité de transcriptase inverse (Zappulla et Cech, 2004). Ainsi plusieurs protéines télomériques lient l'ARN Tlc1 comme Est1p, Est2p, le complexe Ku et les protéines Sm (Dandjinou et al., 2004; Zappulla et Cech, 2004). Quant à lui, le gène *EST1* est un régulateur de l'activité de la télomérase notamment via l'interaction de cette protéine en phase S du cycle cellulaire avec TLC1 et avec la protéine Cdc13p (Evans et Lundblad, 1999; Osterhage et al., 2006; Taggart et al., 2002). Le rôle exact de la protéine Est3p dans l'activité de la télomérase reste à être défini, mais elle est essentielle à l'activité *in vivo* et agit probablement comme régulateur de l'activité de la télomérase (Hughes et al., 2000a; Yang et al., 2006).

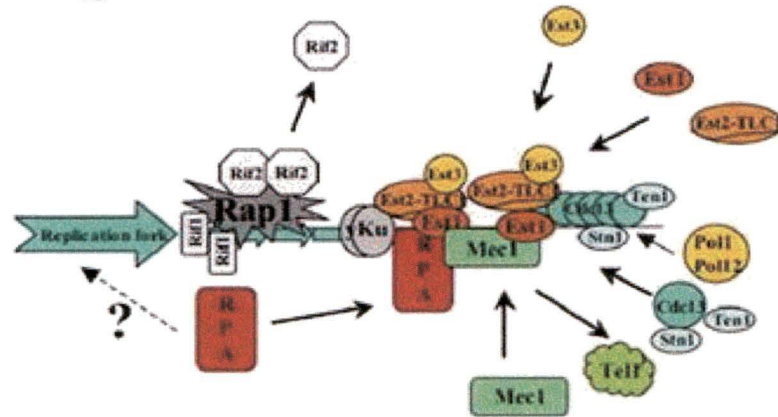
La télomérase allonge les télomères en fin de phase S, après le passage de la fourche de réplication, et différents mécanismes contribuent au recrutement de l'enzyme à son substrat. Elle peut notamment être recrutée via l'interaction de Cdc13p avec le simple-brin combiné à l'interaction de Est1p avec Cdc13p. Il a été démontré qu'en fusionnant ces deux protéines, les télomères sont allongés plus facilement (Evans et Lundblad, 1999). Ainsi, la protéine Cdc13 possède deux fonctions distinctes, soit de protection des télomères, fonction qui est dysfonctionnelle dans l'allèle thermosensible *cdc13-1*, et le recrutement de la télomérase, fonction qui est non fonctionnelle dans l'allèle *cdc13-2* (Nugent et al., 1996). Une seconde voie

importante pour le recrutement de la télomérase est la voie médiée par l'interaction entre le complexe Ku et l'ARN de la télomérase TLC1 (Stellwagen et al., 2003). Le complexe Ku est composé des protéines Yku70p et Yku80p, il est impliqué dans la jonction de fragment non-homologue (non-homologous end-joining, NHEJ) (Boulton et Jackson, 1996) et il est connu depuis longtemps comme un complexe impliqué dans la maintenance des télomères. Les cellules ayant les allèles *yku70Δ* ou *yku80Δ* ont des télomères courts et un simple-brin télomérique beaucoup plus long que les souches WT (Gravel et al., 1998). Donc, le complexe Ku est impliqué dans le recrutement de la télomérase (Fisher et al., 2004) et il a d'autres fonctions reliées à la protection des télomères. Chez les mammifères, le complexe Ku est un complexe conservé qui possède les mêmes fonctions (Ting et al., 2005).

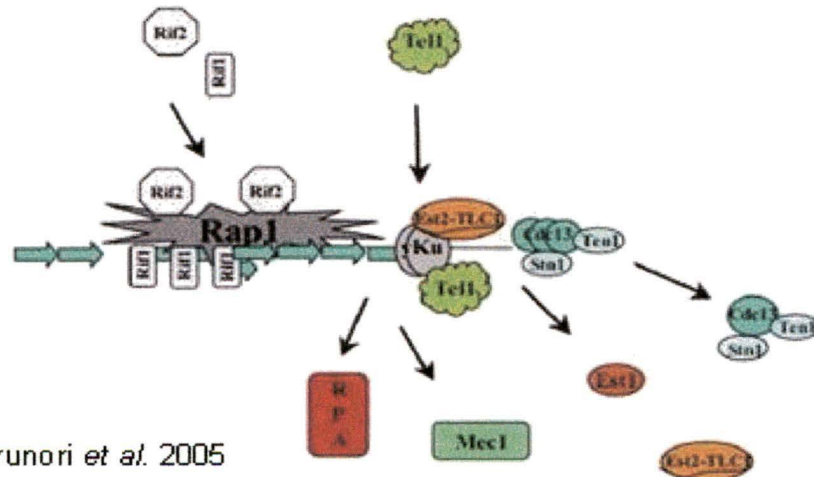
G1



S



G2/M



Tiré de Brunori *et al.* 2005

Figure 4 : Organisation télomérique dans le cycle cellulaire.

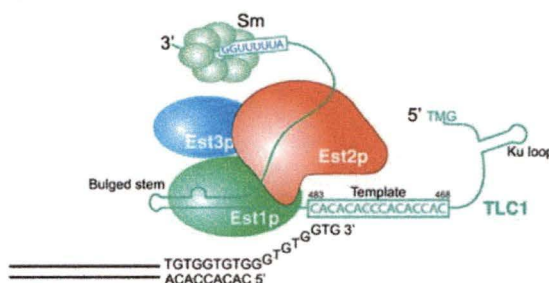
Les flèches bleues représentent les répétitions télomériques et les protéines ou complexes sont représentés par différentes formes de différentes couleurs. Les flèches noires indiquent la période de recrutement ou de dissociation avec les télomères. Voir la description détaillée dans le texte.

Plusieurs autres protéines sont impliquées dans la régulation de la télomérase (Figure 4)(Brunori et al., 2005). Elles sont successivement présentes aux télomères pour moduler l'activité de la télomérase ou la réplication des télomères selon les phases du cycle cellulaire. Durant la phase G1 du cycle cellulaire, la chromatine télomérique est composée minimalement des protéines Rap1, Rif1 et Rif2 (Marcand et al., 1997a; Wotton et Shore, 1997). La protéine Est2 est également présente aux télomères en phase G1 via sa liaison avec TLC1 qui est recrutée soit par son interaction avec le complexe Ku ou via la liaison de la matrice d'ARN avec le simple-brin télomérique (Stellwagen et al., 2003). La protéine Tel1p est également présente aux télomères en phase G1 et sa présence dépend du complexe Ku (Takata et al., 2004). La façon dont Tel1p influence la télomérase n'est pas exactement définie, mais elle agit comme régulateur positif de la télomérase (Ritchie et al., 1999). Cette influence passe probablement par Xrs2p du complexe MRX qui est phosphorylé par Tel1p (Ritchie et Petes, 2000; Shima et al., 2005; Takata et al., 2004). Le complexe MRX est composé des protéines Mre11p, Rad50p et Xrs2p, et il est impliqué dans la réparation des cassures double-brin ainsi que dans la régulation de la télomérase et dans la génération du simple-brin télomérique (Chai et al., 2006b; Larrivee et al., 2004; Ritchie et Petes, 2000).

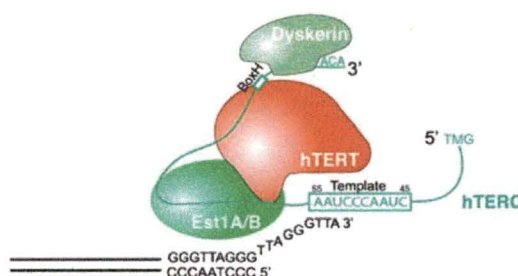
En fin de phase S, probablement après le passage de la fourche de réplication, la structure de la chromatine télomérique est modifiée et ces changements dynamiques enclenchent le processus d'activation de la télomérase. C'est durant cette période que le simple-brin télomérique est généré et est plus long que pendant le reste du cycle cellulaire (Dionne et Wellinger, 1998; Wellinger et al., 1993b). L'augmentation du simple-brin ou le passage de la fourche de réplication recrute le trimère RPA aux télomères par sa liaison à l'ADN (Schramke et al., 2004). Ce complexe permet la

liaison de la protéine Est1 aux télomères par son interaction avec l'ARN de la télomérase (Schramke et al., 2004). Le recrutement de Est1p permet alors l'activité de la télomérase. La liaison entre la polymérase α avec Cdc13p permet la coordination entre l'ajout de répétitions télomériques par la télomérase et la synthèse du brin C-riche (Qi et Zakian, 2000). Une fois que les télomères sont répliqués, il y a réassociation des protéines Rif1 et Rap1 qui inhibent l'activité de la télomérase et évitent la surélongation des télomères. Durant la phase G2/M, les protéines Mec1, Est1, RPA, Est3 et le surplus de protéines Cdc13/Stn1/Ten1 se dissocient des télomères (Figure 4). Les éléments cruciaux de la régulation de la télomérase et du maintien des télomères sont de mieux en mieux caractérisés, toutefois il y a une multitude de gènes (>150 chez *S.cerevisiae*) qui ont un effet direct ou indirect sur le maintien des télomères et les détails de ces effets sont toujours inconnus (Askree et al., 2004; Gatbonton et al., 2006).

A Télomérase de *S.cerevisiae*



B Télomérase humaine



Adapté de Smogorzewska et al. 2004

Figure 5: L'holoenzyme de la télomérase dans la levure et chez l'humain.

A. Les composants de la télomérase de la levure, associés au simple-brin télomérique. L'ARN TLC1 est représenté par une ligne verte et les régions matrice (« template »), la boucle de liaison au complexe Ku (« Ku loop ») de même que le site de liaison des protéines Sm (« Sm ») sont identifiées. B. La télomérase humaine associée à l'extension télomérique simple-brin. L'ARN hTERC est représenté par une ligne verte et la région matrice est identifiée (« template »).

Chez les mammifères, il existe des composantes homologues à celles de la télomérase de levure, par exemple : hTERT correspond à la protéine Est2p et les télomérases de mammifères contiennent eux aussi une molécule d'ARN (TER) (Chen et al., 2000). L'équivalent de la protéine Est1p est également présent chez les cellules humaines sous la forme des protéines hEST1A et hEST1B. Les protéines Sm sont impliquées dans la biogenèse des snRNAs et ont donc vraisemblablement des fonctions dans la maturation des ARNs de la télomérase (Seto et al., 1999). La « dyskerine » est également une protéine qui lie les ARNs et serait impliquée dans la maturation et la stabilité de hTER (Mitchell et al., 1999). Il y a également d'autres protéines qui ont certaines similarités fonctionnelles avec celles de la levure, mais certaines sont particulières aux mammifères et inversement, aucun homologue de la protéine Est3p n'a été identifié chez les mammifères (Figure 5).

La régulation de la taille des télomères

Dans une cellule normale de levure qui exprime la télomérase, la taille des télomères dépend principalement d'un équilibre entre l'action de la télomérase et la dégradation nucléolytique. Il a été démontré par une technique de PCR permettant d'amplifier spécifiquement un télomère et ainsi mesurer son élongation, que la télomérase n'agit pas sur tous les télomères en même temps pendant la phase S, mais qu'elle préfère allonger les télomères courts (Teixeira et al., 2004). La quantité de nucléotides ajoutés par la télomérase pendant un cycle cellulaire est variable et ne dépend pas de la longueur initiale du télomère. Étant donné que la télomérase agit

préférentiellement sur les télomères courts, il y a un moyen pour la cellule d'évaluer la longueur d'un télomère. Ce mécanisme passe par la protéine Rap1 chez la levure et par TRF1 et TRF2 chez les mammifères (Ancelin et al., 1998; Marcand et al., 1997a). Ces protéines lient les répétitions télomériques et ainsi, plus les télomères sont longs plus il y a de molécules liées et une grande quantité de ces protéines aux télomères inhibe la télomérase.

Une multitude de protéines affectent la longueur des télomères et doivent donc affecter de manière directe ou indirecte l'équilibre entre l'action de la télomérase et la dégradation des télomères. Il y a également plusieurs façons d'affecter la télomérase, notamment en influençant son recrutement, son activité, sa processivité ou sa localisation. De la même façon, il y a plusieurs façons de modifier la dégradation des télomères et ainsi modifier l'équilibre et obtenir des télomères de différentes longueurs. Comme il a été illustré à la Figure 4, plusieurs protéines sont toujours présentes aux télomères, peu importe la phase du cycle cellulaire, mais d'autres sont liées de façon transitoire et permettent de réguler l'action de la télomérase. Parmi les protéines transitoires, on compte les protéines Est1p, Est3p, Tel1p, Mec1, le complexe MRX (Mre11p, Rad50p et Xrs2p) et RPA. Les rôles de certaines de ces protéines dans la régulation de l'homéostasie que représente la longueur des télomères sont toujours inconnus ou mal compris. Le rôle de la protéine essentiel Est3p est toujours vague tandis qu'il est clair que Est1 permet d'activer la télomérase en phase S (Evans et Lundblad, 2002). Le complexe MRX participe également au recrutement de la télomérase, en partenariat avec les kinases Tel1p et Mec1p. La délétion de ces deux PIKK (« phosphoinositide 3-kinase related kinases ») entraîne un phénotype EST, elles sont essentielles au recrutement, mais elles sont partiellement redondantes (Naito et al., 1998; Ritchie et al., 1999). Le complexe MRX lie les télomères en fin de phase

S et est nécessaire au recrutement efficace des protéines Mec1p, Est1p et Cdc13p aux télomères (Takata et al., 2005). Par contre, les mutants du complexe MRX n'ont pas de phénotype EST et ont des télomères courts, ce qui suggère que le recrutement par Est1-Cdc13 est suffisant pour une activité minimale de la télomérase *in vivo* (Tsukamoto et al., 2001). Ces informations expliquent pourquoi les souches mutantes *tel1Δ* et *mre11Δ* ont des télomères courts. Comme il a été mentionné dans la section « La télomérase de la levure », le complexe Ku est également important dans le NHEJ et est impliqué dans la régulation de la taille des télomères en participant au recrutement de la télomérase (Evans et al., 1998; Gravel et al., 1998).

La génération du simple-brin télomérique

L'étude des mécanismes impliqués dans la création, le maintien et la régulation de la structure télomérique qu'est le simple-brin est très importante; il a été démontré que cette structure est altérée pendant la sénescence dans des cellules de mammifères (Stewart et al., 2003). Toutefois, l'altération de l'extension G-riche n'est pas responsable de l'induction de la sénescence dans les cellules humaines (Chai et al., 2005) et le raccourcissement des télomères n'est pas dépendant de la longueur de l'extension 3' télomérique (Keys et al., 2004). Pour ce qui est de la régulation de l'extension G-riche, il est connu depuis un certain temps qu'un plasmide linéaire de *S. cerevisiae* acquiert une longue extension G-riche en fin de phase S après le passage de la fourche réplique, et que cette extension est présente même en absence de la télomérase (Dionne et Wellinger, 1996; Wellinger et al., 1996; Wellinger et al., 1993a; Wellinger et al., 1993b). Ces résultats suggèrent qu'au moins à une extrémité des chromosomes, une activité nucléase est nécessaire pour créer une extension 3' simple-brin télomérique. La recherche des facteurs nécessaires à cette activité a occupé

beaucoup de place dans plusieurs projets de recherche. À ce jour, soit la protéine responsable est toujours non identifiées, soit cette activité est accomplie par plusieurs protéines aux activités partiellement redondantes ou que plusieurs protéines sont nécessaires à cette activité. De plus, une extension simple-brin plus courte est présente constamment en dehors de la phase S et l'absence d'un complexe MRX (Larrivee et al., 2004). Cette découverte a été possible en utilisant deux techniques : une technique d'hybridation utilisant différents niveaux de stringence et une technique d'extension d'amorce modifiée, développée par Catherine Lebel et qui fera l'objet d'une partie de ce mémoire. L'homologue du complexe MRX chez les mammifères, MRN (Mre11p, Rad50p, Nbs1p), est également impliqué dans la création de l'extension simple-brin télomérique (Chai et al., 2006b). Toutefois, la déplétion du complexe MRN dans des cellules sans télomérase n'affecte pas le simple-brin, ce qui suggère que l'effet du complexe MRN est dépendant de la télomérase. Bien que la protéine Mre11p possède une activité nucléase, il est peu probable que cette activité est un rôle dans la génération du simple brin puisqu'elle n'est pas impliquée dans la maintenance des télomères (Moreau et al., 1999; Trujillo et al., 1998). L'Exonucléase I, encodée par le gène *EXO1*, est impliquée dans une certaine mesure dans la dégradation du brin C-riche mais principalement dans le cas d'une structure télomérique altérée comme dans les mutants *ku70Δ* ou *cdc13-1* et cette enzyme est responsable du simple-brin qui enclenche les points de contrôle de dommage à l'ADN (Maringele et Lydall, 2002; Zubko et al., 2004). Récemment, une autre exonucléase a été identifiée comme faisant partie du complexe télomérique humain, il s'agit d'Apollo (Lenain et al., 2006; van Overbeek et de Lange, 2006). Elle lie la protéine TRF2 et le complexe « Shelterin » et participe à la protection des télomères humains en prévenant l'activation des signaux de dommage à l'ADN avec la collaboration avec

TRF2. Dans ces études, il est suggéré qu'Apollo pourrait jouer un rôle dans la régulation de la dégradation du brin C-riche et dans le traitement différent que subissent les deux extrémités des chromosomes. Chez la levure, l'homologue d'Apollo est considéré être *PSO2* qui possède le même genre d'activité exonucléase 5'→3' et les mêmes fonctions (Demuth et al., 2004). Le mutant *pso2Δ* est viable et est sensible aux drogues anti-cancer (Brendel et al., 2003; Cassier et Moustacchi, 1981; Henriques et al., 1997). Toutefois, en utilisant la technique d'hybridation à l'intérieur du gel (Dionne et Wellinger, 1996), le mutant *pso2Δ* ne semble pas avoir un simple-brin télomérique anormal (Christian Prud'homme, résultats non publiés). La dégradation du brin C-riche aux télomères s'apparente à la dégradation qui survient lors de la réparation des cassures double-brin (Lee et al., 1998). En faisant un parallèle entre la dégradation aux cassures double-brin et aux télomères, d'autres protéines sont suspectées d'avoir un rôle dans la génération ou la régulation de l'extension télomérique simple-brin. Notamment, le gène *SAE2* qui joue un rôle dans la formation du simple-brin aux cassures double-brins, probablement via des interactions avec le complexe MRX et la kinase Tellp, pourrait jouer un rôle aux télomères (Clerici et al., 2006; Kim et al., 2008; Lee et Lee, 2007; Lengsfeld et al., 2007).

Pour étudier la régulation de la génération du simple-brin télomérique chez la levure *S.cerevisiae*, il est essentiel de développer ou d'améliorer les techniques existantes afin d'obtenir une résolution permettant d'identifier les mutants qui sont viables, mais qui ont un simple-brin altéré comme *mre11Δ*. Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs, comme possiblement Pso2p, ou de préciser le rôle dans la régulation du brin C-riche d'éléments bien caractérisés comme *TEL1* ou le complexe Ku, il est essentiel d'obtenir une technique fiable et reproductible pour étudier ce

phénomène. Une partie de mes études de Maîtrise et de ce mémoire est consacrée à l'obtention d'une telle technique.

La maintenance des télomères en absence de la télomérase

Chez la levure, en absence de télomérase, les télomères raccourcissent à une vitesse de 4-5 pb par division cellulaire et 100-150 pb chez les mammifères (Levy et al., 1992; Lundblad et Szostak, 1989). Cette dégradation mène normalement à un arrêt de croissance chez les levures et à la sénescence chez les cellules de mammifères. Toutefois, il existe d'autres moyens de maintenir l'ADN des télomères que la télomérase, notamment en utilisant la recombinaison homologue. Chez *S. cerevisiae* l'identification de souches capables de maintenir leurs télomères par un autre moyen que la télomérase a été effectuée utilisant une souche *est1Δ* (Lundblad et Blackburn, 1993). Dans ces souches, comme dans tous les mutants ayant un phénotype EST, la majorité des cellules meurent après plusieurs générations, probablement parce que leurs télomères courts sont reconnus comme des cassures double-brin (Hackett et al., 2001). Cependant, il y a apparition de rares survivants qui peuvent pousser continuellement sans une télomérase fonctionnelle (Lundblad et Blackburn, 1993). Ces cellules parviennent à maintenir leurs télomères par recombinaison homologue en amplifiant, soit leurs séquences télomériques ou soit les éléments sous-télomériques (Y') (Figure 6). Ces deux voies permettent la croissance en absence de télomérase et dépendent de la recombinaison homologue et du gène *RAD52* (Chen et al., 2001; Le et al., 1999). Les survivants qui amplifient les régions sous-télomériques sont des survivants de type I et ils dépendent de la protéine Rad51p, l'homologue de RecA (Le et al., 1999). Les survivants de type I se caractérisent lors d'un gel de télomère (Matériel et méthode, Figure 6) par des TRF courts et des bandes correspondant aux régions Y' beaucoup plus intenses. Les survivants de type II nécessitent la protéine

Rad50p pour amplifier les répétitions télomériques et l'analyse par gel de télomère montre une grande hétérogénéité et un grand dynamisme dans la longueur des TRF. Il y a différents mécanismes qui ont été proposés pour expliquer les événements de recombinaison qui permettent aux survivants de type I et de type II de maintenir leurs télomères sans télomérase. D'abord, la recombinaison peut se faire de façon intermoléculaire ; c'est-à-dire qu'une région télomérique peut envahir un autre chromosome avec des séquences homologues et ainsi servir d'amorce pour amplifier ces séquences. De cette façon, des séquences télomériques (type II) ou sous-télomériques (type I) peuvent être amplifiées pour maintenir les télomères par recombinaison. Une variante de ce mécanisme utilise la recombinaison homologue intramoléculaire à partir des séquences homologues sur le même chromosome. Ce mécanisme implique que le simple-brin télomérique envahit, en se repliant, des séquences homologues en amont formant une structure qui s'apparente au t-loop chez les mammifères. Cet événement de recombinaison génère des intermédiaires qui pourraient être à l'origine d'un autre mécanisme d'amplification des télomères par réplication selon le modèle du cercle roulant (Chen et al., 2001). Dans ce modèle, des molécules d'ADN extrachromosomales circulaires, double-brins ou simple-brins, contenant des séquences télomériques qui servent de matrice à l'amplification de séquences télomériques. De telles molécules, appelées des cercles télomériques, ont été retrouvées dans des survivants indépendants de la télomérase chez la levure *K. lactis* et chez *S. cerevisiae* (Cesare et al., 2007; Groff-Vindman et al., 2005; Larrivee et Wellinger, 2006; Tomaska et al., 2000). Avec la présence de ces cercles, on peut imaginer un quatrième moyen de maintenir les télomères, en intégrant ces molécules d'ADN extrachromosomique aux télomères par recombinaison homologue.

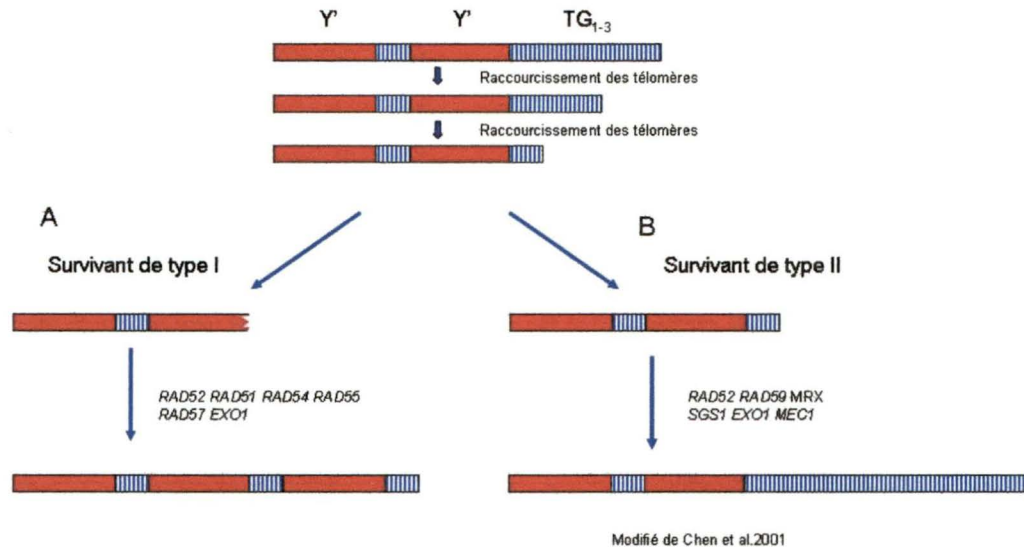


Figure 6: Génération de survivant indépendant de la télomérase par deux voies.

Les télomères d'une cellule qui se divise sans télomérase raccourcissent avec les divisions cellulaires. La majorité des cellules sénescence lorsque les télomères atteignent une longueur critique, mais une faible proportion parvient à maintenir leurs télomères en utilisant deux voies différentes. A) Les survivants de type I amplifient la région sous-télomérique Y' par recombinaison homologue qui nécessite les gènes *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57* et *EXO1*. B) Les survivants de type II amplifient les répétitions télomériques par recombinaison homologue qui dans ce contexte nécessite les gènes *RAD50*, *XRS2*, *MRE11*, *RAD52*, *SGS1*, *EXO1*, *MEC1* et *RAD59*. Différents mécanismes pourraient permettre d'expliquer précisément comment la recombinaison a lieu. Jusqu'à maintenant lequel de ces mécanismes est utilisé n'est pas déterminé. Les bandes rouges correspondent aux régions sous-télomérique Y' et les bandes hachurées bleu et blanc correspondent aux répétitions télomériques. Voir le texte pour plus d'explication.

Plusieurs autres organismes peuvent générer des survivants indépendants de la télomérase dans différentes conditions, notamment chez *K. lactis* et *S. pombe* (Nakamura et al., 1998). Les vertébrés possèdent également les éléments de recombinaison nécessaire au maintien des télomères dans des cellules immortalisées sans télomérase, cette voie se nomme le maintien alternatif des télomères (« alternative lengthening of telomeres » ALT) (Bryan et al., 1997). La recombinaison présente dans les cellules ALT s'apparente à celle des survivants de type II chez la levure. Comme les survivants de type II chez *S. cerevisiae* les cellules ALT ont besoin d'un complexe MRX (MRN pour les mammifères) fonctionnel et d'une gène *RAD52* actif (Dunham et al., 2000). De la même façon, des séquences télomériques

extrachromosomales ont été détectées dans les survivants de type II et dans les cellules ALT sous forme de molécule linéaire, circulaire ou d'intermédiaire de t-loop (Cesare et Griffith, 2004; Ogino et al., 1998; Tokutake et al., 1998). Les détails moléculaires du ALT dans les cellules cancéreuses sont toujours grandement inconnus et l'impact des tumeurs ayant le mécanisme ALT comme mécanisme de maintien des télomères plutôt qu'une réactivation de la télomérase sur les patients reste à étudier.

La télomérase est considérée comme une cible pour le traitement du cancer puisque 85% des tumeurs utilisent la voie de la télomérase pour acquérir l'immortalité (Kim et al., 1994; Shay et Bacchetti, 1997). Cependant, les 15% des tumeurs restantes utilisent la recombinaison ALT pour maintenir leurs télomères ce qui en fait un mécanisme important d'immortalisation et donc une autre cible pour des thérapies anti-cancer.

Les survivants indépendants de la télomérase et du capuchon télomérique

Récemment, il a été démontré que dans certaines circonstances les cellules de levure peuvent vivre sans la protéine essentielle du capuchon télomérique Cdc13p (Petreaca et al., 2006; Zubko et Lydall, 2006). Dans le laboratoire du Dr. Wellinger, Michel Larrivée a caractérisé des survivants indépendants de la télomérase qui peuvent survivre sans Cdc13p (Larrivee et Wellinger, 2006). Dans cette étude, il a été démontré que des survivants indépendants de la télomérase de type I et II (voir la section « La maintenance des télomères en absence de la télomérase ») peuvent s'adapter à la perte de la protéine Cdc13p et maintenir leur télomère par un mécanisme alternatif. Les cellules sans Cdc13p, appelées $\Delta 13$ -I ou $\Delta 13$ -II selon le type de survivant original, possèdent des caractéristiques propres aux survivants et d'autres propres aux cellules $\Delta 13$. Ces cellules effectuent le cycle cellulaire normalement, bien

qu'une faible proportion de cellules meure et elles ont un rythme de division apparemment normal. Les survivants de type I et II possèdent de l'ADN circulaire extra chromosomique totalement ou partiellement simple-brin. Les cellules $\Delta 13$ -I contiennent le même genre de molécule circulaire que les survivants de type I, par contre les cellules $\Delta 13$ -II contiennent des cercles télomériques de longueur variable en plus de cercles Y' (Larrivee et Wellinger, 2006). Ces molécules peuvent être le résultat d'événements de recombinaison où peuvent servir à initier des événements de recombinaison.

Un autre aspect très intéressant des cellules $\Delta 13$ est que la perte de Cdc13p passe par une inactivation des réponses aux points de contrôle. Les télomères sans Cdc13p initient les points de contrôle (comme décrit dans la section Protection des télomères) et cause un arrêt du cycle cellulaire. Par contre, dans les cellules $\Delta 13$ tout ce processus est aboli (Larrivee et Wellinger, 2006). Cette abolition est toutefois réversible et si on réintroduit un plasmide portant le gène *CDC13*, les points de contrôle peuvent être activés et les cellules ne sont plus sensibles aux agents endommageant l'ADN (Larrivee et Wellinger, 2006). Donc, ce processus d'adaptation, d'abolition des points de contrôle suite à la perte de Cdc13p, est réversible ce qui suggère qu'il n'implique pas des mutations, ou des réarrangements chromosomiques, mais bien une régulation quelconque des points de contrôle. Le moyen que les cellules $\Delta 13$ prennent pour abolir les points de contrôle est inconnu et une partie de ce mémoire est consacré à tenter d'identifier des gènes dont l'expression est différente dans les $\Delta 13$ et qui pourraient être impliqués dans l'abolition des points de contrôle. Nous avons utilisé l'analyse transcriptionnelle par puce à ADN pour tenter d'identifier la façon que les cellules parviennent à abolir les points de contrôle de façon permanente en absence de Cdc13p.

Le phénomène d'adaptation aux signaux des points de contrôle en présence d'une cassure double-brin.

Normalement, les points de contrôle de dommage à l'ADN servent à arrêter le cycle cellulaire lorsque des dommages significatifs sont détectés, afin de laisser le temps aux mécanismes de réparation de réparer les dommages avant la poursuite du cycle cellulaire. Une fois le dommage réparé, les cellules récupèrent et désactivent les points de contrôle pour reprendre le cycle cellulaire. Lors d'une cassure double-brin induite, les points de contrôle détectent le dommage et arrêtent le cycle cellulaire. Si le dommage est irréparable, les cellules peuvent rester arrêtées, ou éventuellement, elles contournent l'arrêt des points de contrôle pour poursuivre leur cycle cellulaire. Ce phénomène est appelé l'adaptation (Lee et al., 1998; Sandell et Zakian, 1993; Toczyski et al., 1997). Il a été mis en évidence en utilisant un dommage double-brin irréparable induit sur un chromosome non essentiel, dans ce contexte, les cellules avec un dommage peuvent s'adapter à la cassure et former des colonies. Si la cassure survient sur un chromosome essentiel, les cellules peuvent également s'adapter, mais l'instabilité génomique créée par la cassure non réparée entraîne la mort des cellules après une ou quelques divisions (Bennett et al., 1993). Une multitude de protéines est requise pour permettre l'adaptation, parmi elles, des protéines impliquées dans la régulation de la chromatine et la recombinaison comme les protéines Yku70, Yku80, le complexe comprenant Swi2/Snf2/Rad54, Tid1, Rad51, Srs2 et Sae2. D'autres protéines nécessaires à l'adaptation sont évidemment impliquées dans les points de contrôle comme Ptc2, Ptc3, Ckb1, Ckb2 et Cdc5 (Clerici et al., 2006; Lee et al., 1998; Lee et al., 2001; Lee et al., 2003; Leroy et al., 2003; Pelliccioli et al., 2001; Toczyski et al., 1997; Vaze et al., 2002). Le niveau d'expression de certaines de ces protéines peut

avoir un effet sur la probabilité d'adaptation suite à un dommage, notamment la surexpression de *PTC2* permet aux cellules mutantes *yku80* et *cdc5-ad* de s'adapter.

Comme il a été mentionné précédemment, la déprotection des télomères induit un arrêt du cycle cellulaire par l'activation des points de contrôle et dans les cellules $\Delta 13$, les points de contrôle sont désactivés. Cette désactivation des points de contrôle en réponse à la déprotection des télomères est un phénomène qui pourrait s'apparenter à l'adaptation aux cassures double-brins.

Les objectifs principaux.

Un premier objectif de mes recherches est d'étudier la structure de l'extension télomérique simple-brin et ainsi en apprendre plus sur sa génération, son maintien et sa régulation. Donc, d'identifier les gènes impliqués dans ces différents aspects et caractériser leurs rôles précis. Pour ce faire, il est essentiel de développer et améliorer des outils techniques permettant de mesurer l'extension télomérique simple-brin de façon précise et reproductible. L'établissement de telles techniques est indispensable à l'étude de cette structure des télomères.

Dans un autre domaine, mes recherches ont comme objectif d'étudier les structures alternatives de maintien des télomères lorsque les ceux-ci sont déprotégés. Donc, l'objectif est de caractériser les cellules $\Delta 13$ qui possèdent une structure télomérique altérée qui ont été découverte par Michel Larrivée dans le laboratoire du Dr. Wellinger. L'objectif est donc d'identifier les mécanismes et les molécules impliqués dans la génération et le maintien des cellules $\Delta 13$ qui peuvent survivre sans télomérase et sans la protéine essentielle Cdc13 qui protège normalement les télomères.

Chapitre 1 :

Étude du simple-brin télomérique : Optimisation d'une technique

Préambule :

Le simple-brin télomérique est crucial pour le maintien des télomères puisqu'il sert de site de liaison à la région matrice de *TLC1* et donc de substrat à la télomérase (Prescott et Blackburn, 2000). Les mécanismes de génération du simple-brin étant en grande partie inconnus, il est donc intéressant de pouvoir mesurer cette extension. Avec une technique permettant de mesurer précisément le simple-brin télomérique, il serait possible, en observant le phénotype de souches de levure mutantes, de mieux comprendre les mécanismes de générations du simple-brin. Il existe plusieurs techniques permettant de détecter le simple-brin télomérique dans les cellules de mammifère ou chez *Tetrahymena thermophila* mais peu de techniques permettant de mesurer l'extension simple-brin télomérique chez la levure *S. cerevisiae* et aucune ne possède une résolution suffisante. Étant donné que le simple-brin télomérique de levure est très court et hétérogène, il est difficile d'être en mesure de distinguer des différences très faibles de longueur dans certains mutants qui ont des déficiences au niveau de la création ou la maintenance de l'extension simple-brin.

Objectif spécifique :

L'objectif de cette partie est d'améliorer la résolution des techniques permettant de mesurer l'extension télomérique simple-brin. Notamment, la technique que Catherine Lebel dans le laboratoire a développée en s'inspirant d'une technique développée pour l'organisme *Tetrahymena thermophila* (Jacob et al., 2001; Larrivee et al., 2004). Elle a développé la technique d'extension d'amorce modifiée pour mesurer la longueur du simple-brin télomérique chez la levure. Cependant, cette technique est demeurée sous-utilisée à cause du défi technique qu'elle représente et à cause d'un

certain manque de reproductibilité et de fiabilité des résultats. J'ai donc travaillé à identifier les réactions limitantes et à optimiser chaque étape de la technique afin d'en faire une technique fiable et utilisable de façon routinière pour identifier des mutants qui ont un simple-brin télomérique altéré (Voir la section « La génération du simple-brin télomérique » dans l'Introduction).

Matériel et méthodes

Culture de bactéries

Une culture saturée de bactéries *E.coli* DH5 α contenant un plasmide avec le gène amp^R peut être obtenue en inoculant environ 3mL de milieu liquide LB (1% bacto-tryptone, 1% chlorure de sodium, 0,5% yeast extract, pH ajusté à 7) contenant 50ng/mL d'ampiciline dans un tube stérile. La bactérie *E.coli* est généralement cultivée à 37°C. Une culture saturée peut être utilisée pour faire un stock congelé (1mL de culture et 1mL de glycérol 30%) conservé à -80°C ou une préparation de plasmide. Une préparation de plasmide (miniprep) peut être réalisé en utilisant des colonnes Qiagen (Mississauga, ON, Canada) selon le protocole du manufacturier ou selon le protocole très bien établi de minipréparation d'ADN plasmidique (Birboim et Doly, 1979; Ish-Horowicz et Burke, 1981; Sambrook et al., 1989). Les bactéries DH5 α peuvent également être cultivées sur milieu solide auquel on ajoute de l'agar à 2% qu'on coule dans des plats de Pétris. Sur ce type milieu, il est possible d'isoler des colonies générées suite à la division d'une seule cellule.

Culture de levures

Les levures peuvent être cultivées comme des bactéries en milieu liquide ou solide (section Culture de bactéries) (Rose, 1990; Zakian et Scott, 1982). Les milieux

utilisés sont différents et on utilise généralement du milieu riche YEPD (1% yeast extract, 2% peptone, 0.01% adenine, 2% glucose, 2% agar pour les milieux solides) ou du milieu synthétique Yeast complete (Yc : 0.17% yeast nitrogen base, 0.1% acide glutamique L, mélange d'acides aminés 1,2g/L, 2% glucose pH 6.0). Il est également possible de faire pousser les levures sur une autre source fermentable de carbone comme le raffinose, le galactose ou le glycérol.

Manipulation d'acide nucléique

Les techniques brièvement résumées dans cette section sont toutes bien établies et sont décrites, notamment, dans le manuel de clonage moléculaire de Maniatis (Sambrook et al., 1989)

Les acides nucléiques peuvent être extraits à partir d'un lysat cellulaire en utilisant une solution de phénol/chloroforme (volume égal de phénol équilibré et de chloroforme). Les acides nucléiques seront présents dans la phase aqueuse de l'extraction. Les acides nucléiques, présents dans cette phase, peuvent être concentrés par précipitation à l'éthanol 100% contenant des sels. On récupère, ensuite, les acides nucléiques précipités par centrifugation à environ 16000 x g à 4°C. Le précipitat contient les acides nucléiques et les sels, ceux-ci peuvent être enlevés avec un lavage à l'éthanol 70% suivi d'une autre centrifugation. Normalement, le culot ainsi obtenu est séché et les acides nucléiques sont resuspendus dans une solution et un volume appropriés aux expériences à effectuer.

Souches

La souche identifiée WT est en fait la souche MLY50 et la souche identifiée *mre11Δ* est la souche MLY51 (Brachmann et al., 1998; Larrivee et al., 2004). La souche sans le complexe Ku, *yku70Δ*, est la souche BYku70Δ (Gravel et Wellinger,

2002) et la souche identifiée *tell1Δ* est la souche RWY51-7D (Chakhparonian et al., 2005).

Purification d'ADN génomique de levure

La purification d'ADN génomique a été principalement effectuée en utilisant la technique d'extraction avec billes de verres et NIB (Huberman et al., 1987). Le tampon NIB (nuclear extraction buffer) permet d'extraire les noyaux des cellules avant de les lyser pour extraire l'ADN. Cette technique peut nous permettre d'obtenir de l'ADN de meilleure qualité. Les extractions ont été effectuées en cultivant les levures dans milieu (exemple : YEPD ou Yc) et un volume de culture approprié, une fois les levures précipitées par centrifugation, le culot est lavé avec de l'eau. Ensuite le culot est resuspendu dans le tampon NIB (17% glycérol, 50mM MOPS pH 7,5, 150mM acétate de potassium, 2mM de chlorure de magnésium, 500μM de spermidine et 150μM de spermine) pré-refroidi à 4°C. Les billes de verres sont ensuite ajoutées pour briser les parois des cellules, alterner des séquences de vortex pendant 30 secondes et de repos sur glace pendant 30 secondes et répéter ces séquences jusqu'à ce que la majorité des cellules soit lysées. Récupérer le tampon des billes et rincer les billes 3 fois avec du NIB. Centrifuger à 6000g pendant 10 min à 4°C et resuspendre dans le tampon de lyse (50mM Tris-Cl, 20mM EDTA, 100mM NaCl) dans un volume permettant d'avoir une concentration d'environ 2×10^7 cellules/mL selon la quantité de cellules de départ. Ajouter 1,5% du détergent sarcosyl pour lyser les noyaux. Ensuite, le lysat doit être débarrassé de l'ARN par un traitement à la RNase A (100μg/mL) à 37°C pendant 30min et les protéines doivent être digérées en ajoutant la protéinase K (0.5mg/mL) à 37°C pendant 1h. Centrifuger à 9500g et extraire le surnageant 3 fois

avec du phénol, du phénol/chloroforme et du chloroforme. Finalement, précipiter l'ADN et laver le culot avec de l'éthanol 70% (Sambrook et al., 1989).

La même technique peut être utilisée en utilisant une digestion à la zymolyase plutôt que les billes de verres pour briser la paroi cellulaire (Holm et al., 1986).

Quantification d'acide nucléique

J'ai utilisé le spectrophotomètre (Ultraspec 2100pro de Biochrom) pour quantifier les concentrations d'acide nucléique en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 260nm (DO_{260}). Pour de l'ADN double-brin, le coefficient d'extinction est en moyenne de $50 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$, ce qui veut dire qu'une densité optique de 1 correspond à une concentration de $50\mu\text{g/mL}$ (Labarca et Paigen, 1980; Munro et Fleck, 1966; Sambrook et al., 1989). Les concentrations d'ADN génomique quant à elles ont surtout été déterminées avec le fluorimètre (DynaQuant DQ200 de Hoefer) selon les instructions du manufacturier. En utilisant un colorant fluorescent, le Bisbenzimidazole H33258 (Hoechst), qui se lie à l'ADN il est possible de déterminer la concentration d'ADN dans un échantillon en comparant avec un standard de concentration connue. Cette méthode permet de détecter seulement l'ADN et pas l'ARN ce qui est utile pour quantifier l'ADN présent dans une préparation d'ADN génomique qui peut toujours contenir de l'ARN en grande quantité.

Radio marquage d'oligonucléotide par transfert de phosphate

Cette technique consiste à marquer un oligonucléotide d'ADN à son extrémité 5' en échangeant le phosphate présent par un phosphate radioactif, ceci en utilisant l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4 PNK) et du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000Ci/mmol). L'enzyme T4 PNK de la compagnie NEB (Pickering, ON, Canada) a été utilisé selon le protocole de la compagnie ou l'enzyme purifiée dans le département par Catherine Desrosier avec la même procédure. On incube 200ng d'oligonucléotide, 4 uL de $[\gamma\text{-}$

^{32}P]ATP(3000Ci/mmol), 9,8 Unités de PNK dans le tampon approprié à 37°C pendant 45 minutes. Ensuite, on ajoute 30uL de TE 1x et on purifie l'oligonucléotide radiomarquée avec une colonne G-50 microspin (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) en suivant le protocole de la compagnie.

Radio marquage par extension d'amorce

Cette technique est utilisée pour radiomarquer un fragment d'ADN en lui incorporant des nucléotides radioactifs comme les [α - ^{32}P]dCTP (3000Ci/mmol). Le protocole utilisé provient de Feinberg et Vogelstein 1983, et l'enzyme Klenow provient de NEB (Pickering, ON, Canada) ou a été purifiée au département par Catherine Desrosier. Le fragment d'ADN (50-250ng) est d'abord dénaturé et ensuite mélangé avec un tampon, une amorce hexanucléotide de séquence aléatoire et l'enzyme Klenow. Le mélange est incubé à température pièce pour une durée variant de 2h30 à 16h. Finalement, la réaction est arrêtée et le fragment est purifié avec les colonnes G-50 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada).

Technique d'extension d'amorce modifiée (Larrivee et al., 2004) (Figure 7)

La technique d'extension d'amorce modifiée a été développée et utilisée par Catherine Lebel pour mesurer l'extension télomérique simple-brin. Une partie de cette étude a été consacrée à l'amélioration de cette technique pour être en mesure de l'utiliser efficacement et de façon routinière. Pratiquement chaque étape a été modifiée pour en améliorer l'efficacité, mais je vais énumérer ici les étapes principales, de même que les conditions standards des différentes réactions.

A) Enrichissement des fragments de restrictions terminaux (TRF)

Selon une estimation basée sur la taille du génome de la levure, les TRF représente seulement environ 0,3% de l'ADN génomique total, il est donc nécessaire de faire un enrichissement en fragment télomérique afin d'obtenir des résultats. Pour ce faire,

environ 100µg d'ADN génomique sont requis. Premièrement, l'ADN génomique purifié est digéré avec l'enzyme de restriction XhoI et séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose 0,6% TAE dans un ou des grands puits pouvant contenir toute la digestion. Plusieurs marqueurs de poids moléculaire sont nécessaires proches de ces pistes. Une fois la migration terminée, il faut identifier la zone du gel qui contient les fragments désirés (les TRF d'une souche sauvage sont d'environ 1.2kb et de 1kb pour une souche avec les télomères courts), afin de purifier des TRF. De préférence, il faut éviter le contact avec l'agent intercalant, le bromure d'éthidium, donc on colore seulement la partie du gel qui contient les marqueurs et ainsi déterminer la position des TRF. Ensuite on extrait l'ADN de la section du gel qui contient les fragments entre 1kb et 1,6kb avec le « gel extraction kit » de Qiagen (Mississauga, ON, Canada). Plusieurs autres façon d'enrichir et de concentrer les TRF on été essayées et elles seront décrites dans la section des résultats.

B) Quantification des TRF purifiés

L'ADN total peut être quantifié en utilisant les techniques habituelles de fluorimétrie ou de spectrométrie (voir Quantification d'ADN) de façon à égaliser la quantité de TRF purifiés entre les échantillons. Les TRF peuvent également être quantifiés de façon spécifique en utilisant l'hybridation de type Southern. D'abord, les préparations de TRF purifiés et des solutions standard contenant une quantité connue de fragment de séquence télomérique (la sonde télomérique) doivent être transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue normalement avec un appareil de transfert en point (« dot-blot ») qui permet de transférer des protéines ou des acides nucléiques sur une membrane. La membrane est ensuite hybridée, avec une sonde télomérique radiomarquée, selon la méthode d'hybridation de type Southern. Les signaux obtenus peuvent être quantifiés suite à l'exposition sur une cassette de

PhosphorImager (Storm Imager) et la quantité de TRF peut être déterminée en comparant les signaux avec ceux obtenus pour le fragment d'ADN standard.

C) Ajout de la queue poly-A

L'ajout de la queue poly-A en 3' des TRF purifiés sert à positionner et hybrider une amorce Poly-T qui permettra de mesurer la longueur du simple brin télomérique. Plusieurs oligonucléotides contrôles ont été utilisés pour servir de substrat à cette réaction afin de déterminer les conditions optimales. La terminale deoxynucléotidyle transférase (TdT) est utilisée pour effectuer cette réaction. L'enzyme commerciale de la compagnie Amersham a été utilisée dans différentes conditions, de même qu'une TdT recombinante portant une étiquette Histidine qui a été purifiée au département de microbiologie et infectiologie par Catherine Desrosier à partir du plasmide produit par C. Papanicolaou (Boule et al., 1998). Une réaction standard utilise 20-80 unités de TdT, 1ng d'oligonucléotide ou environ 250ng total de TRF purifiés, 250µM de dATPs, le tampon One-Phor All 1x (10mM Tris-acétate, 10mM acétate de magnésium, 50mM d'acétate de potassium) (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). Le mélange est ensuite incubé à 37°C pour 20 minutes. La réaction est arrêtée avec 0.5M d'EDTA 1/10volume, suivi d'une extraction phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol 100%. Le culot est ensuite resuspendu dans du tampon PE1 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM chlorure de magnésium, 50 mM chlorure de sodium et 1 mM dithiothreitol) pour l'appariement de l'amorce (généralement 15 µL). Plusieurs modifications ont été apportées à ce protocole et elles seront décrites dans les sections résultats et discussion.

D) Appariement de l'amorce poly-T

L'amorce doit s'apparier à la queue PolyA tout en étant correctement positionné à l'extrémité de l'extension télomérique afin de pouvoir être étendu jusqu'à

la jonction double-brin. L'appariement de l'amorce Poly-T est effectué à température pièce de 3h à 16h dans un tampon PE1 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM chlorure de magnésium, 50 mM chlorure de sodium et 1 mM dithiothreitol). Plusieurs substrats ont été utilisés, soit avec une queue polyA ajoutée (TRF purifiés ou DUP16) ou avec une queue PolyA synthétisée (DUP16PolyA). Différentes amorces ont été testées afin de déterminer la longueur et le nombre de nucléotides d'alignement optimal (voir la section résultat Figure 11 et Tableau 3)

E) Extension de l'amorce

L'extension de l'amorce PolyT jusqu'à la jonction double-brin permet de mesurer le simple-brin télomérique. Il faut s'assurer d'augmenter l'efficacité de l'extension et de limiter les produits d'extension partiels, et les produits de déplacement. L'extension de l'amorce a toujours été effectuée en utilisant une T4 ADN polymérase recombinante gracieusement fournie par Mme Krantz et en utilisant le tampon utilisé par ce laboratoire (Elisseeva et al., 1999) (67mM Tris-HCl pH8,8, 16,6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5mM dithiothreitol, 6,7mM MgCl_2 , 167 $\mu\text{g/ml}$ d'albumine sérique bovine, 250nM de dATP, 250nM de dCTP). La réaction est incubée à 30°C pour 10 minutes et est arrêtée par une extraction phénol/chloroforme qui est suivie d'une précipitation dans 2 volumes d'éthanol 100% et 2/3 volumes d'acétate d'ammonium 5M. Le culot est séché et resuspendu dans 4-5 μL de tampon de chargement (formamide 80%, EDTA 10mM pH8, xylene cyanol FF 1mg/ml, bleu de bromophenol 1mg/ml). Finalement, les produits d'extension sont visualisés sur un gel dénaturant d'urée/polyacrylamide 15%.

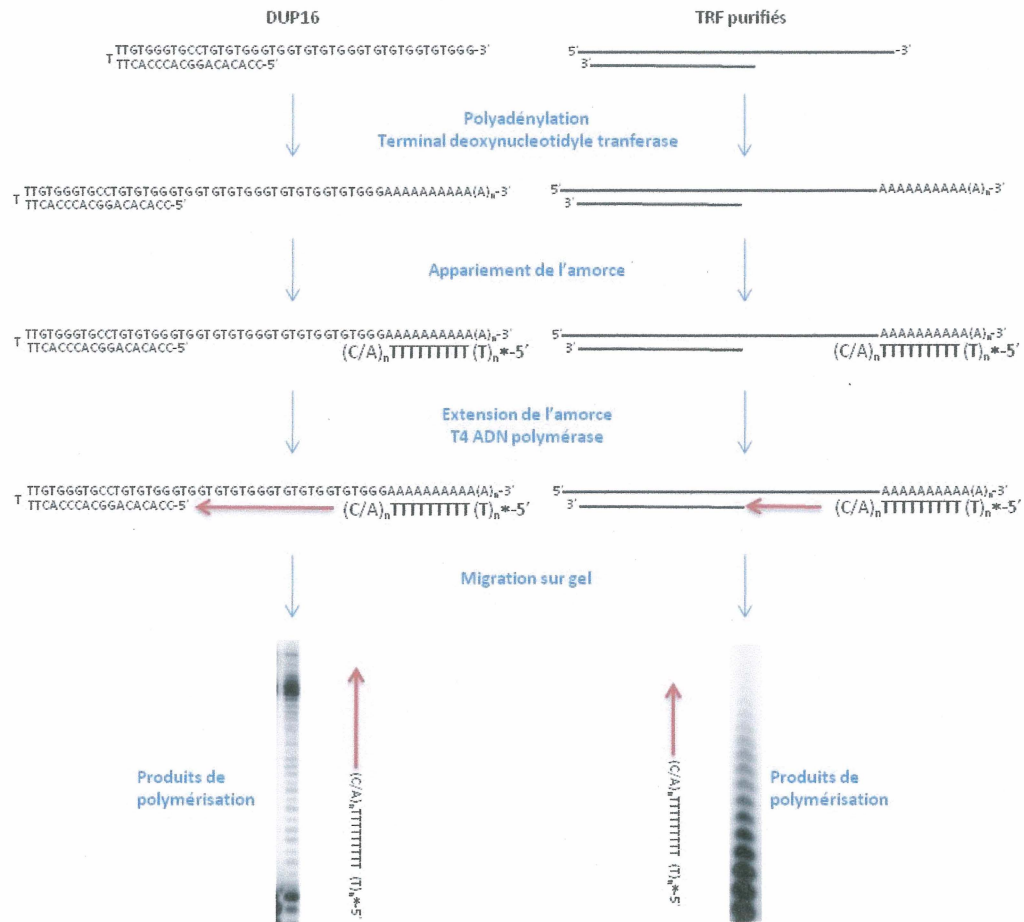


Figure 7: Schématisation de la technique d'extension d'amorce modifiée pour mesurer le simple-brin télomérique

Différents substrats sont utilisés, un oligonucléotide pour servir de contrôle, et les TRF purifiés afin de mesurer le simple-brin. La première étape consiste en l'ajout d'une queue polyA en 3' avec la terminal deoxynucleotidyle transférase pour servir de site d'appariement à l'amorce. Ensuite l'amorce s'apparie avec les substrats polyadénylés et est polymérisée jusqu'à la jonction de l'ADN double-brin. Finalement, les produits d'extensions sont migrés sur gel et l'étendu de la polymérisation nous donne la longueur du simple-brin des molécules substrats.

Traitement à l'Exonucléase I

L'Exonucléase I possède une activité spécifique aux extrémités simple-brin 3' d'ADN (Lehman et Nussbaum, 1964). Elle peut être utilisée pour digérer spécifiquement le simple-brin télomérique et ainsi utiliser l'échantillon traité comme contrôle négatif quant à la présence du simple-brin (Dionne et Wellinger, 1996).

Pour traiter l'ADN génomique avant une analyse du simple-brin télomérique par hybridation in gel il faut utiliser 1-2µg d'ADN. On effectue la réaction dans le tampon ExoI 1x (67mM glycine pH 9.5, 10mM 2-mercaptoéthanol, 6,7 mM de chlorure de magnésium) en utilisant 20U d'enzyme ExoI (NEB, Pickering, ON, Canada). Les réactions doivent être incubées à 37°C pendant 2-16h et arrêtées avec 1 volume de solution stop (20mM EDTA, 300mM chlorure de sodium). Une fois la réaction terminée, on extrait l'ADN avec 1 volume de phénol-chloroforme et on précipite les acides nucléiques avec l'éthanol 100%. L'ADN traité peut ensuite être digéré avec XhoI pour analyser les TRF. Pour les réactions d'extension d'amorce modifiée, le traitement ExoI est effectué à partir de TRF purifiés. Lorsque ce sont des TRF purifiés qui sont traités à l'ExoI, la même quantité est utilisée pour les échantillons traités et non traités et le traitement s'effectue de la même façon que le traitement de l'ADN génomique.

Traitement à la nucléase Mung Bean

L'endonucléase spécifique simple-brin Mung Bean (NEB, Pickering, ON, Canada) a été utilisé avec le même objectif que l'Exonucléase I. Les conditions et le tampon utilisé sont fournis par la compagnie et le traitement a été effectué de la même manière que celui à l'Exonucléase I.

Purification des TRF par chromatographie d'exclusion.

A) Détermination de la résolution de la purification pour des fragments d'ADN

Une chromatographie d'exclusion a été effectuée afin de tenter de purifier des TRF de levure avec une plus grande efficacité et enrichissement qu'avec l'extraction de gel d'agarose (Griffith et al., 1999). Une résine Sephacryl S-500 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) possédant une limite d'exclusion de 1078pb pour l'ADN

selon le manufacturier, a été montée dans une colonne de 30cm par 1 cm pour FPLC dont le volume final est de 24ml. Un marqueur d'ADN a ensuite été appliqué dans la colonne et l'élution a été effectuée dans du TE 1x (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) à un flot de 1mL/min. Le détecteur du FPLC a mesuré la densité optique à 260nm afin de détecter les fragments d'ADN lors de l'élution. Les fractions d'élution de 0.5mL ont été récoltées grâce à un collecteur de fraction. Le contenu de chaque fraction a été précipité dans l'éthanol 100% et 0.3M d'acétate de sodium. Les fractions ont ensuite été analysées sur gel d'agarose coloré au Bromure d'éthidium.

B) Purification des TRF de YLpFAT10 par chromatographie d'exclusion.

La purification des fragments d'ADN dans ces conditions permet d'enrichir un fragment plus petit que 500pb mais pas de 1,2kb comme des TRF. Le plasmide linéaire YLpFAT10 (Wellinger et al., 1993a) a alors été utilisé pour obtenir des fragments de restriction terminaux plus petits que 500bp. Ce plasmide contient des séquences télomériques aux deux extrémités et se comporte comme un mini chromosome. Il possède également un site de restriction pour l'enzyme EcoRI qui permet de libérer des TRF d'environ 250-300pb lorsque le plasmide est maintenu dans une souche de type sauvage et d'environ 50pb lorsqu'il est maintenu dans une souche mutante qui possède normalement des télomères courts (Figure 8). Il est donc possible de digérer l'ADN total d'une souche contenant le plasmide YLpFAT10 avec EcoRI et de produire des fragments de restriction terminaux du plasmide. Pour les purifier, l'ADN total (~10µg) doit être digéré avec EcoRI et les fragments ainsi générés sont extraits avec du phénol-chloroforme pour ensuite être précipités avec de l'éthanol. L'ADN total digéré peut maintenant être chargé sur la colonne dans un volume d'environ 0.5ml. On effectue l'élution en utilisant 1,5 volume de colonne de TE 1x

pH 8,0. Afin de caractériser la purification, l'éluat est récupéré en différentes fractions et le contenu de chaque fraction est précipité pour être analysé par hybridation de type Southern. Les fragments contenant des séquences télomériques sont visualisés pour analyser l'efficacité de purification.

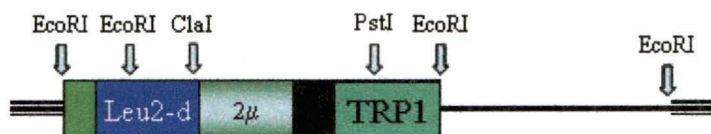


Figure 8 : Plasmide linéaire YLpFAT10

Le schéma représente graphiquement la carte du plasmide linéaire YLpFAT10 (Wellinger et al., 1993a). Les sites de coupure pour différentes enzymes de restriction sont identifiés par une flèche (¶). Les lignes triples représentent les séquences télomériques du plasmide. La région identifiée Leu2-d représente le marqueur de sélection Leu2-d et la région *TRP1* représente la localisation du gène *TRP1*. L'origine de réplication 2μ est également représentée.

Gel de télomère

Cette technique utilise le site de restriction *XhoI* présent à l'intérieur des répétitions Y' (voir introduction) pour libérer des fragments de restriction terminaux (TRF) qui nous permettent d'évaluer la longueur des télomères (Louis et Haber, 1990). D'abord, l'ADN génomique est digérée avec *XhoI* (NEB, Pickering, ON, Canada) et appliquée sur un gel 0,75% d'agarose TBE pour séparer les différents fragments. Ensuite, ce gel peut être transféré et hybridé avec une sonde télomérique radioactive (voir Buvar dage de type Southern) ou séché et être hybridé directement à l'intérieur du gel (voir Hybridation dans le gel « in gel »).

Hybridation dans le gel « in gel »

Ce type d'hybridation permet de détecter un signal en condition native et elle est principalement utilisée pour détecter le simple-brin télomérique (Dionne et Wellinger, 1996). Elle consiste à sécher un gel de télomère (voir Gel de télomère) à température pièce avec un sécheur de gel généralement pendant 12-24 minutes de

chaque coté. Ensuite on hybride un oligonucléotide radiomarqué en 5' complémentaire à la région simple-brin ciblée dans la solution d'hybridation (5xSSC, 5x solution Denhardt, 0,1x P-wash, 0,04µM ATP, 20µg/mL d'ADN de sperme de saumon.) à 37°C. Finalement, il suffit de laver le gel dans une solution de 0.25x SSC et de l'exposer sur un autoradiogramme. Suite à l'hybridation en condition native, il est possible de dénaturer le gel et le réhybrider, ou de le transférer sur une membrane de nylon Hybond-N (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). Il faut s'assurer de contrôler que le gel est bien demeuré en condition native en utilisant des fragments simple-brin et double brin, de même que de s'assurer que le signal observé est bien le simple-brin télomérique en traitant certains échantillons avec des nucléases spécifiques (Dionne et Wellinger, 1996).

Tableau 2: Séquence des oligonucléotides utilisés dans l'essai d'extension d'amorce modifiée.

Oligonucléotides	Séquence
Poly-T18(C/A)	5'-CGGAATTCCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
DUP16	5'-CACACAGGCACCCACTTTTGTGGGTGCCTGTGTGGGTGGTG TGTGGGTGTGTGGTGTGGG-3'
DUP16PolyA	5'-CCACACAGGCACCCACTTTTGTGGGTGCCTGTGTGGGTGGTG TGTGGGTGTGTGGTGTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
PolyT8 CC	5'-TTTTTTTCC-3'
PolyT8 AC	5'-TTTTTTTAC-3'
PolyT8 CA	5'-TTTTTTTCA-3'
PolyT10 CC	5'-TTTTTTTCC-3'
PolyT10 AC	5'-TTTTTTTAC-3'
PolyT10 CA	5'-TTTTTTTCA-3'
POLY T/ACA	5'-TTTTTTTAC-3'
POLY T/ACC	5'-TTTTTTTACC-3'
POLY T/CAC	5'-TTTTTTTCAC-3'
POLY T/CCA	5'-TTTTTTTCCA-3'
POLY T/CCC	5'-TTTTTTTCCC-3'

Résultats

Pour optimiser la technique d'extension d'amorce modifiée, nous devons travailler à optimiser l'appariement et l'extension de l'amorce, la spécificité et l'efficacité de la polyadénylation des TRF et la purification des TRF. Les problèmes de fiabilité et de reproductibilité rencontrés sont fort probablement dus au fait qu'il y a plusieurs étapes peu efficaces dans cette technique et que d'un essai à l'autre, il arrive de ne pas atteindre le seuil d'efficacité requis pour obtenir un résultat concluant. Ceci explique pourquoi il est possible d'obtenir des résultats intéressants (Larrivee et al., 2004) (Figure 9) mais au prix d'un très grand nombre de répétitions infructueuses. Normalement, cette technique peut nous permettre d'identifier et de caractériser des souches de levures possédant certaines mutations qui peuvent affecter la longueur du simple-brin télomérique. Comme on peut observer dans la Figure 9 A et 9 B, il est possible d'obtenir une polymérisation de différente longueur selon la provenance des TRF utilisés. Il a déjà été établi par hybridation à l'intérieur du gel que les souches mutantes *yku70Δ* possèdent un long simple-brin télomérique (Gravel et al., 1998), mais la longueur exacte de ce simple-brin était demeurée inconnue. Dans la Figure 9 on remarque que la polymérisation faite sur des TRF de souche WT se rend jusqu'à environ 15 nucléotides alors que pour les TRF d'une souche *yku70Δ* l'extension se poursuit jusqu'à 24 nucléotides. Cette extension est bien représentative du simple-brin télomérique puisque lorsque les TRF sont traités à l'Exonucléase I le signal est grandement diminué. L'Exonucléase I a une activité 3'-5' qui dégrade l'ADN simple-brin, donc elle peut dégrader le simple-brin télomérique et nous permet d'utiliser des échantillons traités comme contrôles négatifs. Dans ces expériences, des oligonucléotides servant de substrats sont inclus pour contrôler la polyadénylation (DUP16) et l'extension (DUP16PolyA) (Figure 7 et Figure 9). Il est également

possible de constater que la polymérisation sur TRF de souche *mre11Δ* (Figure 9 a piste 9) semble se rendre moins loin que pour le WT comme précédemment décrit (Larrivee et al., 2004).

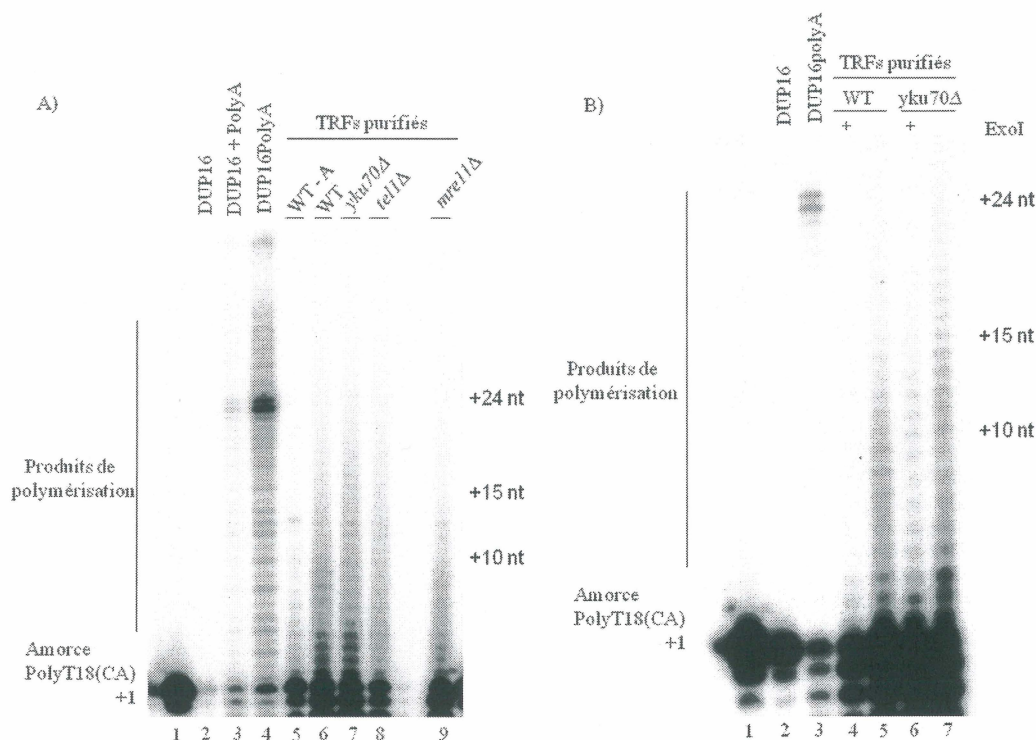


Figure 9: Exemples de résultats concluants de la technique d'extension d'amorce modifiée originale.

Les étapes de purifications, de polyadénylation, d'appariement et d'extension ont été effectuées telles qu'il a été décrit dans la section Matériel et méthodes. Les TRF purifiés ont été analysés par hybridation dans le gel pour s'assurer que la purification a été effectuée en condition native et que les TRF purifiés se comportent comme les TRF non purifiés quant à la longueur du simple-brin. A) Les pistes 1 à 4 sont les contrôles. La piste #1 est l'amorce seule, la piste #2 est l'oligonucléotide DUP16 sans polyadénylation, la piste #3 est le DUP16 qui a été polyadénylé et la piste #4 est le DUP16PolyA qui sert de contrôle pour l'étape d'extension. Pour la piste 5 l'extension a été effectuée sur des TRF purifiés (200ng) de souche WT mais qui n'ont pas été polyadénylés. Les pistes 6 à 9 représentent l'extension effectuée sur des TRF purifiés (200ng) de différentes souches mutantes qui ont, ou devrait avoir, des phénotypes de simple-brin télomérique altéré. B) Les pistes 1-3 sont les contrôles (voir en A). Les pistes 4 à 7 représente, comme en A, l'extension sur des TRF (250ng) de souche WT ou de souche *yku70Δ*, cependant pour les pistes 4 et 6, les TRF ont été traité à l'exonucléase I (+) avant la polyadénylation.

Cependant, ces résultats font exception et la majorité des tentatives ne permettent pas de tirer des conclusions claires. Il y a différents problèmes, parfois il

n'y a pas de polymérisation sur TRF malgré les contrôles, parfois il y a une amplification non spécifique dépendante de la polyadénylation et d'autres fois il y a une polymérisation qui est toujours la même, peu importe la source de TRF. Pour régler ces problèmes, il est important d'optimiser au maximum chaque étape pour obtenir, finalement un meilleur essai. Dans les prochaines sections, je vais décrire les différentes façons que nous avons utilisées pour tenter d'optimiser la technique.

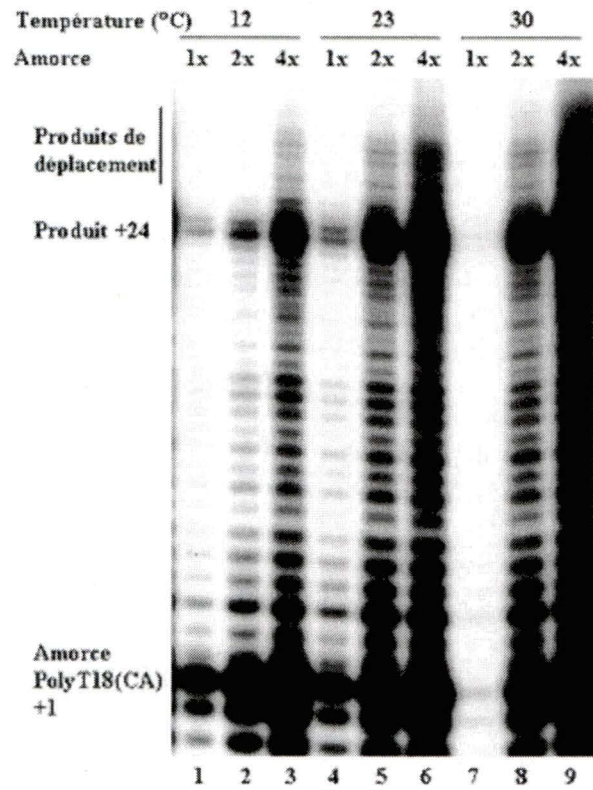
Optimisation de l'appariement et de l'extension d'amorce

D'abord, une étape simple à optimiser est l'extension d'amorce parce qu'elle peut se faire *in vitro* avec des oligonucléotides comme substrat, de plus nous avons obtenu une nouvelle T4 ADN polymérase recombinante du Dr. Reha-Krantz à tester.

L'extension de l'amorce par la T4 ADN polymérase (Goulian et al., 1968) (voir Figure 9) jusqu'à la jonction du double-brin est une étape cruciale. Il est important de contrôler son efficacité et sa processivité afin de maximiser les amorces polymérisées et de minimiser les produits de déplacement qui surviennent lorsque la polymérase déplace le duplex d'ADN double-brin pour continuer à étendre le nouveau brin polymérisé (da Silva et Reha-Krantz, 2000). Donc, nous avons tenté de déterminer les conditions optimales pour réaliser notre essai particulier. Nous avons utilisé l'oligonucléotide DUP16PolyA (Tableau 2, Figure 10 et 11) qui contient des séquences télomériques à polymériser afin de nous rapprocher des conditions réelles. D'abord, différentes quantités relatives de substrat et d'amorce ont été utilisées pour obtenir des conditions où le maximum de molécules de substrat participe à l'extension de l'amorce ; un ratio de 4 molécules d'amorces pour 1 molécule de substrat a été utilisé lorsque le substrat est un oligonucléotide (données non montrées, Figure 10a). L'élongation de l'amorce a également été effectuée à différentes températures (Figure

10a). On remarque que l'enzyme fonctionne aussi bien à 12°C qu'à 23°C ou 30°C. Il y a un signal similaire de produits d'extension finale et de bandes intermédiaires qui apparaissent lorsque la polymérase arrête son élongation. Lorsque l'on modifie la quantité d'enzyme T4 ADN polymérase utilisée, il n'y a aucune modification tant qu'à la qualité d'extension (Figure 10b), donc 20nM d'enzyme on été utilisé pour les expériences subséquentes. La nature et la concentration des nucléotides à inclure dans la réaction peuvent également modifier l'efficacité de l'extension (Reha-Krantz, communication personnelle). Plusieurs combinaisons de nucléotide on été utilisée à différentes concentrations (Figure 10b) et on remarque que la présence des 4 nucléotides ne change pas la polymérisation sur le substrat DUP16PolyA comparativement à l'utilisation de seulement les 2 nucléotides nécessaires à notre essai. Il est également important de noter que si la concentration de nucléotides est plus grande que 100μM, il n'y a plus d'amélioration de l'extension. Finalement, l'extension sur oligonucléotide substrat prépolyadénylé (DUP16PolyA) fonctionne bien et semble assez robuste. Il est difficile de trouver des moyens de l'améliorer.

A)



B)

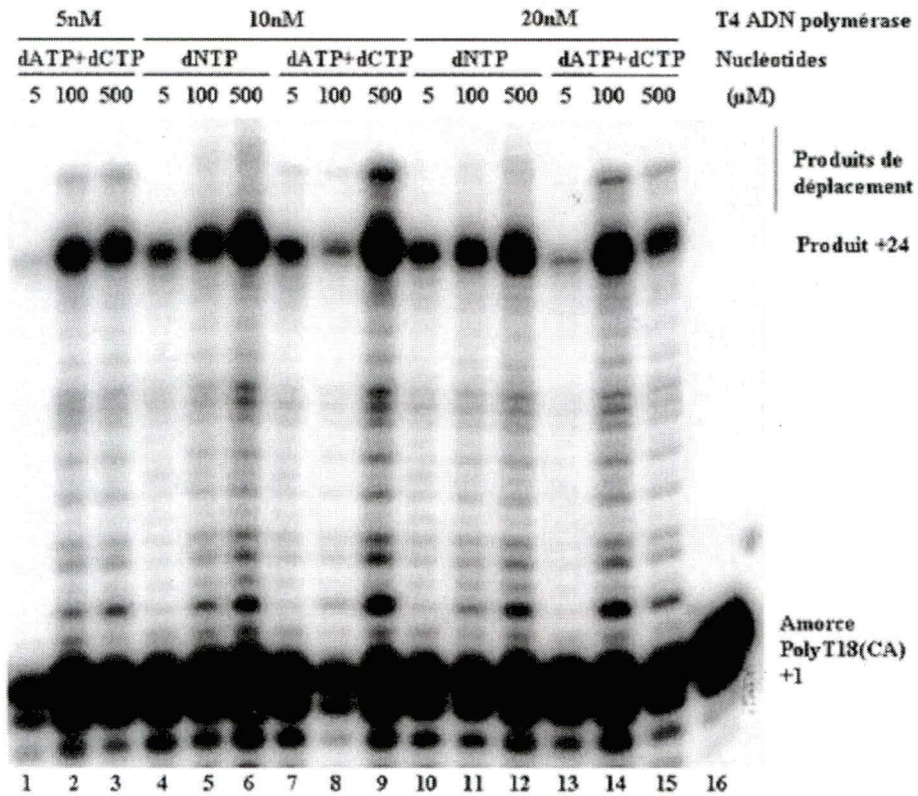


Figure 10 : Résultats d'optimisation de l'extension d'amorce.

Le substrat DUP16PolyA (0.024pmol) a été utilisé avec l'amorce PolyT18(C/A). A) L'extension a été effectuée avec la T4 ADN polymérase recombinante (20nM) à 12°C (pistes #1-3), à 23°C (pistes #4-6) et à 30°C (pistes #7-9), en utilisant différentes quantités d'amorces pendant 10 min B) La T4 ADN polymérase a été utilisée à 5nM (pistes 1-3), 10nM (pistes 4-9) et 20nM (pistes 10-15), les réactions ont été incubées à 30°C pendant 10 minutes. L'extension a été effectuée soit en utilisant les 4 nucléotides (dNTP) ou seulement les nucléotides complémentaires aux séquences télomériques (dATP+dCTP). Ces nucléotides ont été utilisés à 5, 100 ou 500µM.

Pour s'assurer que nous utilisons les conditions optimales, il est important de vérifier l'extension de l'amorce dans un contexte où la queue polyA est ajoutée à la TdT et donc qui est d'une longueur variable. Cette étape est essentielle à notre technique puisqu'elle pourrait influencer l'appariement de l'amorce, et par conséquent l'extension de celle-ci. Dans cette optique, plusieurs amorces ont été créées, elles possèdent des caractéristiques différentes afin de trouver la meilleure combinaison (Tableau 2). Les amorces PolyT ont deux caractéristiques importantes qui peuvent influencer leur appariement, d'abord, la longueur de la série de thymidine-5'-triphosphate. Selon la température d'appariement et d'extension, la longueur de la région polyT de l'amorce aura un impact sur la proportion de molécules appariées et donc sur la portion des molécules qui vont pouvoir être étendues. La seconde caractéristique importante est le nombre de nucléotides d'appariement, c'est-à-dire le nombre de nucléotides en 3' de l'amorce qui ne s'apparieront pas à la queue polyA mais au simple-brin télomérique. Il est crucial pour que l'amorce soit allongée que ces nucléotides s'apparient exactement à la fin du simple-brin, ils servent à positionner l'amorce, et parce qu'il y a seulement des dATP et dCTP dans la réaction d'extension, c'est seulement lors d'un appariement parfait qu'il y aura extension. Les nucléotides d'appariement sont un mélange de combinaison de C ou de A pour qu'ils soient complémentaires aux séquences télomériques TG₁₋₃. Ainsi, l'amorce identifiée PolyT8(C/A)₂ contient les oligonucléotides PolyT8 CC, PolyT8 AC et PolyT8 CA,

l'amorce PolyT10(C/A)₂ contient PolyT10 CC, PolyT10 AC et PolyT10 CA, l'amorce PolyT14(C/A)₃ contient 5 oligonucléotides ; POLY T/ACA, POLY T/ACC, POLY T/CAC, POLY T/CCA et POLY T/CCC, tandis que l'amorce PolyT18 (C/A) a été synthétisée avec un C ou un A en 3' (Tableau 2). Ces différentes amorces ont donc été utilisées pour optimiser la température d'appariement et d'extension en se servant des substrats DUP16 polyadénylé et DUP16PolyA. Les quatre amorces permettent une polymérisation jusqu'à la jonction double-brin (+24 nt), aux quatre températures utilisées sur un substrat polyadénylé ou contenant déjà une queue polyA (Figure 11a et 11b). Par contre, l'efficacité d'extension est différente selon les conditions utilisées. On remarque que pour les amorces avec une petite queue polyT, la quantité de produits d'extension est beaucoup plus faible à température élevée (Figure 11a pistes 6-9 et 14-17) et qu'inversement, les amorces PolyT14(C/A)₃ et PolyT18(C/A) donnent plus de produits à température élevée. Ces conclusions sont illustrées dans le Tableau 3 qui montre le pourcentage de produit d'extension sur la quantité d'oligonucléotide total dans les diverses conditions. Il est important de mentionner que dans cette expérience, il y a au moins deux facteurs qui influencent le résultat ; l'efficacité d'appariement de l'amorce et l'efficacité de la polymérase à une température donnée, nous mesurons la combinaison de ces deux effets. Les conditions optimales d'amorce, d'appariement et d'extension sont selon cette expérience ; l'amorce PolyT14(C/A)₃ appariée et étendue à 37°C. Ce sont ces conditions qui donnent la meilleure efficacité d'élongation utilisant les deux substrats (Tableau 3). À partir de cette expérience, nous pouvons également conclure que, peu importe l'amorce ou la température utilisée, il y a beaucoup moins de produits finaux lorsque le substrat est polyadénylé avec la TdT comparativement à lorsqu'il possède déjà une queue polyA (Figure 11a et 11b, Tableau 3a comparativement à 3b). On observe également

beaucoup de dégradation des amorces lorsque le DUP16 est utilisé (Figure 11a pistes 4,6 et 8 et Figure 10b pistes 2, 4 et 6) et donc que la polyadénylation avec l'enzyme TdT semble augmenter la dégradation des amorces dans l'étape d'extension de l'amorce. Toutes ces données démontrent que la polyadénylation semble problématique et nécessite de l'optimisation.

Les amorces ont été radiomarquées en 5', appariées, polymérisées et ensuite visualisées sur un gel de polyacrylamide 15% dénaturant (matériel et méthodes). Deux méthodes de polyadénylation ont été utilisées pour les substrats, l'oligonucléotide DUP16PolyA (identifié A) a été synthétisé avec une queue polyA, et le DUP16 (identifié +) a été polyadénylé avec la TdT en utilisant les conditions décrites dans le matériel et méthodes. L'appariement et l'extension d'amorces ont été effectués aux différentes températures indiquées. A) Les pistes 1 et 18 contiennent les amorces seules. Les amorces PolyT8(C/A)₂ (piste 2-9) et PolyT10(C/A)₂ (pistes 10-17) ont été utilisés pour l'extension dans différentes températures d'appariement et d'extension, et en utilisant les deux différents substrats. B) Les pistes 1 et 18 contiennent les amorces seules. Les amorces PolyT14(C/A)₃ (piste 2-9) et PolyT18(C/A) (pistes 10-17) ont été utilisés pour l'extension dans différentes températures d'appariement et d'extension, et en utilisant les deux différents substrats.

A) Substrat DUP16PolyA pré-polyadénylé

Pourcentage du produit / oligonucléotide total

Amorce PolyT utilisée	16°C	23°C	30°C	37°C
T ₈ (C/A) ₂	29,0	17,5	11,9	2,1
T ₁₀ (C/A) ₂	28,7	23,2	34,2	11,8
T ₁₄ (C/A) ₃	10,0	25,2	49,5	73,6
T ₁₈ (C/A)	7,0	25,1	42,7	68,6

B) Substrat DUP16 polyadénylé avec la TdT.

Pourcentage du produit / oligonucléotide total

Amorce PolyT utilisée	16°C	23°C	30°C	37°C
T ₈ (C/A) ₂	3,9	7,8	5,2	0,9
T ₁₀ (C/A) ₂	3,7	11,8	8,7	2,1
T ₁₄ (C/A) ₃	4,3	5,8	8,4	44,3
T ₁₈ (C/A)	3,7	2,6	4,9	5,0

Tableaux 3 : Détermination de l'amorce et des conditions d'extension qui favorisent les produits d'extension.

Les signaux des amorces radiomarquées de la Figure 11 A) et B) ont été quantifiés en utilisant une cassette de détection pour le *PhosphorImager* (Storm Imager). Un rapport a été calculé avec le signal provenant des produits d'extension et le signal total dans chaque piste. Ce rapport a été calculé en pourcentage (%). A) Les signaux provenant des pistes contenant le substrat DUP16PolyA la Figure 11 a) et b) ont été analysés. B) Les signaux provenant des pistes contenant le substrat DUP16 polyadénylé à la Figure 10 a) et b) ont été analysés

Optimisation de la polyadénylation avec la Terminale deoxynucléotidyle transférase (TdT).

La TdT est une enzyme qui catalyse l'incorporation de deoxynucléotides aux extrémités 3' OH des molécules d'ADN, double-brin ou simple-brin. Les extensions 3' simple-brin sont un substrat particulièrement efficace et l'ajout de nucléotides aux extrémités franches ou aux extensions 5' est beaucoup moins efficace (Kato et al.,

1967; Roychoudhury et al., 1976). Pour la technique d'extension d'amorce modifiée, la polyadénylation sert à apparier et positionner l'amorce qui, une fois étendue, nous permet de mesurer le simple-brin. Il y a deux facteurs qu'il faut optimiser pour que la queue polyA soit idéale pour notre essai, premièrement la polyadénylation doit s'effectuer sur le maximum de molécule possible pour maximiser l'utilisation de nos molécules TRF purifiées (voir Matériel et méthodes), deuxièmement la longueur de la queue polyA devrait être suffisante pour apparier les amorces, mais pas trop longue ce qui viendrait à séquestrer les amorces dans une position où il est impossible qu'elles servent à l'extension. Une façon simple de vérifier si l'ajout d'une queue polyA est efficace, est d'utiliser l'oligonucléotide substrat DUP16 radiomarké en 5' et d'effectuer les réactions de polyadénylation ; si il y a une queue polyA d'ajoutée l'oligonucléotide sera plus grand et migrera plus lentement lors d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide. Il sera alors possible d'estimer la longueur de la queue polyA ainsi que la proportion des molécules de substrat qui a été polyadénylée. Lorsqu'on effectue l'expérience on peut constater qu'effectivement (Figure 12a), seulement une minorité d'oligonucléotides est polyadénylée et la longueur de la queue polyA augmente avec le temps, mais pas vraiment l'efficacité. Selon cette expérience, on peut estimer qu'il y a moins de 50% des oligonucléotides avec une queue polyA, ce qui pourrait en partie expliquer nos difficultés. L'efficacité s'améliore si on utilise plus d'enzyme, sauf que dans ces conditions la queue polyA générée sera trop longue. De plus, étant donné le coût de l'enzyme commerciale, il est difficile d'utiliser encore plus d'enzyme pour nos essais. Malgré le fait que cette étape semble peu efficace, il est possible de savoir si les TRF purifiés que nous utilisons sont adéquatement polyadénylés. L'expérience consiste à utiliser des TRF comme substrat à la polyadénylation, faire migrer ces TRF polyadénylés sur gel d'agarose et ensuite faire

une hybridation à l'intérieur du gel avec une sonde spécifique à la queue polyA (oligonucléotide polyT). Ainsi, s'il y a polyadénylation, les TRF seront détectables. Les résultats présentés à la Figure 12b montrent quand utilisant une sonde PolyT, les TRF ne sont pas détectés sans TdT mais qu'en présence de la TdT les TRF polyadénylés peuvent être visualisés. La longueur de la queue polyA est dépendante de la quantité d'enzyme, du temps de réaction et de la quantité de nucléotides par rapport au substrat. En utilisant 45ng de TRF purifiés, il y a une augmentation croissante du signal de polyadénylation avec l'augmentation de la quantité de dATP et cela jusqu'à 150µM (Figure 12b, pistes 2, 3, et 4). Les TRF utilisés dans cette expérience proviennent d'une souche WT et correspondent à un fragment de 1,2 kb. Par contre, le signal est détecté jusqu'à 1,6kb ce qui suggère que certaines queues polyA sont très longues. Finalement, les conditions optimales pour la polyadénylation sont de 50µM de dATP pour 50 ng de TRF purifiés, 40 U de TdT incubée à 37°C pendant 20 min (Figure 12b piste 3).

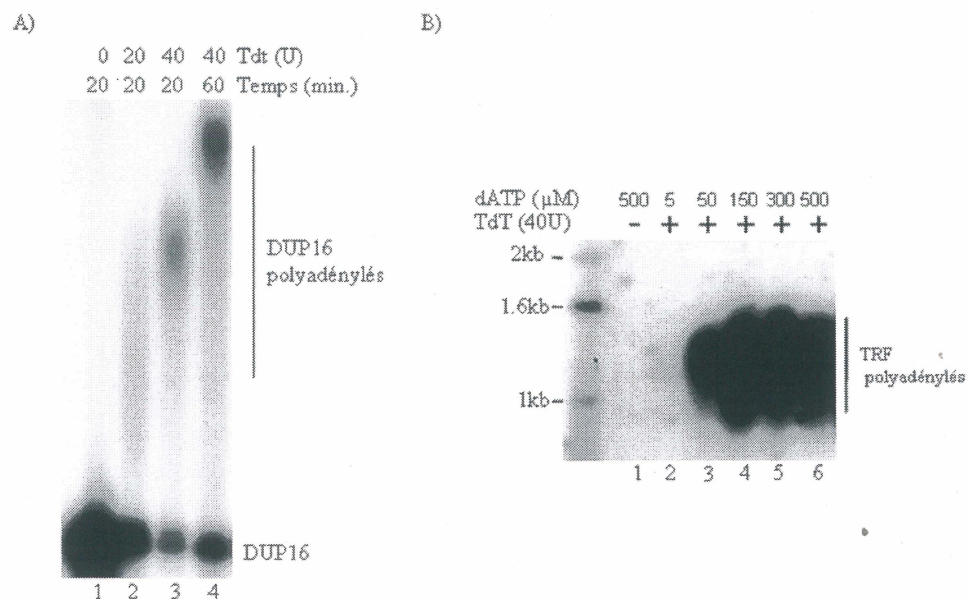


Figure 12 : Vérification de l'efficacité de la polyadénylation sur un substrat oligonucléotide et sur TRF purifiés.

A) La polyadénylation a été effectuée sur 1ng de DUP16 radiomarké en utilisant 250µM de dATP, l'enzyme TdT de GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada) et les réactions ont été incubées à 37°C. Les réactions ont été visualisées sur un gel dénaturant de polyacrylamide 15% B) La polyadénylation a été effectuée sur 45ng de TRF purifiés de souche WT, utilisant 40U de TdT de Amersham, une quantité variable de dATP et la réaction a été incubée à 37°C pendant 20 minutes. Les TRF polyadénylés ont été visualisés par une hybridation à l'intérieur du gel d'une sonde PolyT.

Il y a une autre particularité de la TdT qui pourrait nous causer des problèmes c'est que l'enzyme préfère les extrémités 3' saillantes, mais peut se servir d'extrémité franche ou d'extension 5' avec une très faible efficacité (Kato et al., 1967; Roychoudhury et al., 1976). Il fallait donc vérifier si dans nos conditions, l'enzyme pouvait ajouter une queue polyA aux extrémités 5' saillante. Comme la coupure de l'enzyme XhoI, qui est utilisée pour générer les fragments de restriction terminaux, produit une extrémité saillante de 4 nucléotides en 5', il est important de nous assurer que ce n'est pas tous les fragments de restriction qui sont polyadénylés. Ceci, parce que les TRF sont purifiés en fonction de leurs tailles, mais il y a d'autres fragments de restriction de la même taille suite à la digestion de l'ADN génomique avec XhoI qui seront co-purifiés. Plusieurs fragments de restriction d'ADN plasmidique ont été utilisés ; certains ont été produits par des enzymes de restriction produisant des extrémités 5' saillantes, d'autres avec des extrémités 3' saillantes et un fragment possédant les deux types d'extrémités (Figure 13a, F1, F2 et F3 respectivement). Les fragments F1 et F2 ont donc été mélangés et ajoutés à une réaction de TdT pour déterminer lequel serait polyadénylé préférentiellement. La même chose a été effectuée avec le fragment F3 pour confirmer que la TdT ajoute des dATP seulement à l'extrémité 3' saillante. Dans cette expérience, les fragments qui n'ont pas été polyadénylés ne sont pas détectés (Figure 13b piste 1 et 4), tandis que dans les pistes 2 et 3 les deux fragments sont détectés. Donc, le fragment F1 possédant des extrémités 5' saillantes peut être polyadénylé, cependant cette queue polyA est beaucoup moins

délectable que celle observée pour le fragment F2 de 1,3kb. La même conclusion peut être faite avec le fragment F3 qui, lorsqu'il est digéré avec l'enzyme EcoRI après la polyadénylation (piste 6), nous permet seulement de voir le fragment avec une extension 3', ou le fragment non-digéré. Ces expériences permettent de conclure qu'effectivement, dans les conditions utilisées, la TdT a une préférence marquée pour les extensions 3' mais elle peut, dans une faible mesure, utiliser les extrémités 5' saillantes comme substrat.

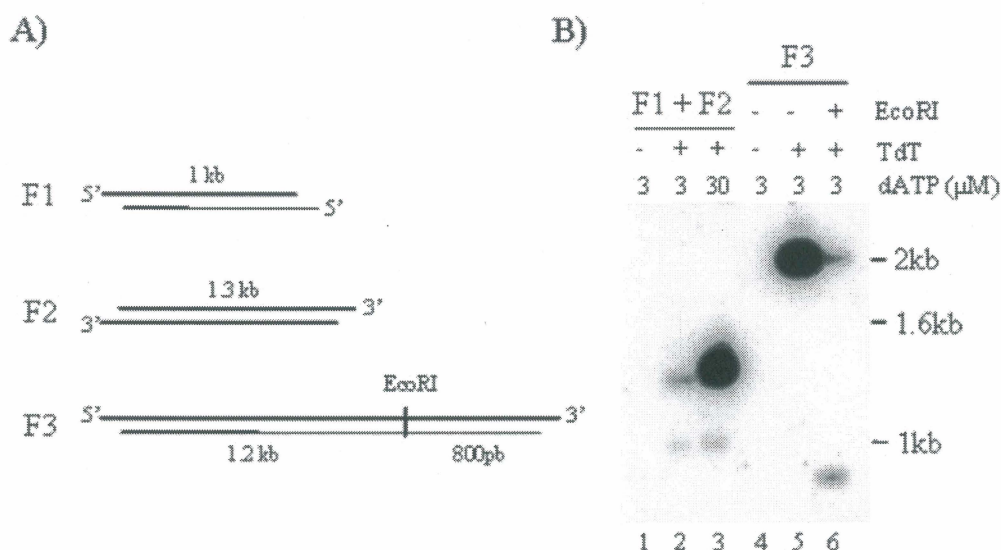


Figure 13 : Vérification de la spécificité de la TdT.

A) Différents fragments d'ADN plasmidique possédant des extrémités saillantes 3' ou 5' ont été obtenus suite à la digestion avec des enzymes de restriction. Ces fragments ont servi de substrat à la polyadénylation par la TdT afin de déterminer si la polyadénylation s'effectuait seulement aux extrémités 3'saillantes. B) Les fragments d'ADN polyadénylé ont été chargés sur un gel d'agarose et suivant la migration, une hybridation à l'intérieur du gel avec une sonde PolyT a été effectuée (voir matériel et méthodes). Le fragment F3 polyadénylé a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoRI pour libérer des fragments de 800pb et 1,3kb à la piste 6.

Ces expériences nous ont permis d'affirmer que la polyadénylation est une étape peu efficace et que les tentatives d'optimisation, notamment en modifiant le temps d'incubation, la quantité d'enzyme et la concentration de dATP, n'ont pas permis de la rendre beaucoup plus efficace.

Finalement, nous avons obtenu un plasmide codant pour la TdT murine possédant une étiquette histidine (Boule et al., 1998). L'enzyme a été exprimée et purifiée par Catherine Desrosier. Avec cette TdT abordable et disponible en grande quantité, il a été possible d'effectuer des expériences nécessitant beaucoup plus d'enzyme. L'objectif est d'obtenir une réaction de polyadénylation qui est plus efficace, qui permet à un maximum de molécules substrats d'être polyadénylé en 3', et surtout qui permet d'avoir une queue polyA d'une longueur adéquate.

En plus de la TdT recombinante, un tampon mieux approprié à la TdT que le One-Phor-All 1x (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada), un tampon cacodylate (Roychoudhury et al., 1976) a été utilisé. L'essai de la TdT recombinante est présenté à la Figure 14 ; une grande quantité d'enzyme (240U), des concentrations de 1, 10 et 50µM de dATP et de courts temps d'incubation (30 sec à 5 min) ont été les conditions de cet essai. Premièrement, on remarque que la concentration de dATP n'a pas d'impact sur la longueur de la queue polyA ou sur l'efficacité de polyadénylation. Deuxièmement, lorsque le temps de réaction est de 30 sec ou 1 min, il n'y a pas de changement de la longueur de la queue polyA, par contre, de 2 à 5 min on note une nette augmentation. Une queue polyA de cette taille n'est pas désirable puisqu'il faut une queue polyA d'environ 20 nucléotides, suffisante pour l'appariement de l'amorce et cette longueur est déjà atteinte après 30 sec de réaction (Figure 14, résultats non montrés). Troisièmement, l'efficacité de polyadénylation, calculée à la Figure 14, est constante peu importe le temps de réaction et varie peu selon la concentration de dATP. Finalement, il est possible d'obtenir une réaction de polyadénylation optimisée et idéale pour notre essai d'extension d'amorce modifiée en utilisant la TdT recombinante (240U), un court temps de réaction (1 minute), 50µM de dATP et un tampon cacodylate/chlorure de cobalt. Cette réaction permet d'obtenir une efficacité

de polyadénylation sur oligonucléotide DUP16 d'environ 70% ce qui est largement supérieur à l'efficacité précédemment obtenue (Figure 12, résultats non montrés).

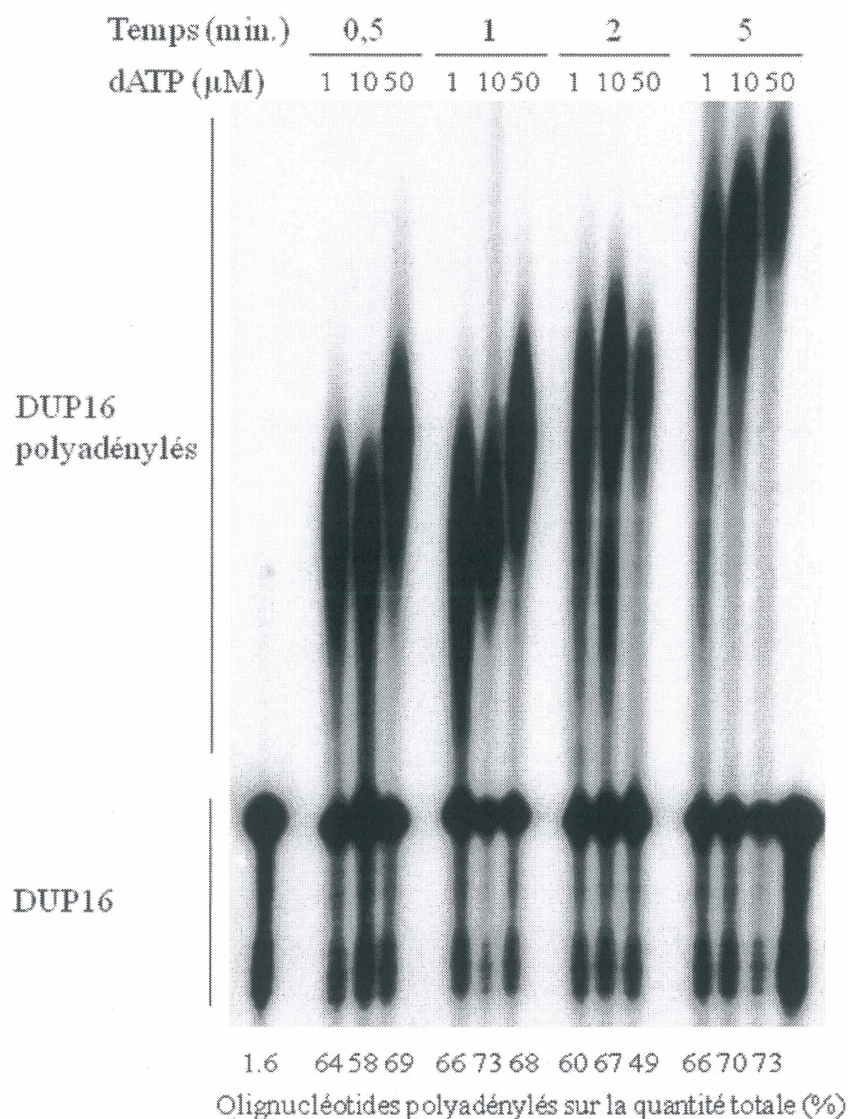


Figure 14: Efficacité de la polyadénylation avec la TdT recombinante.

L'oligonucléotide DUP16 a été radiomarké puis 0.026pmol/réaction ont été polyadénylés utilisant différentes conditions. La TdT recombinante, purifiée par Catherine Desrosier, a été utilisée à forte concentration (240U/réaction) pendant peu de temps (30 sec à 5 min) avec différentes concentrations de dATP et dans un tampon cacodylate (200mM cacodylate de potassium (pH7.0), 0,1mM DTT, 1mM chlorure de cobalt) pour améliorer l'efficacité. L'efficacité a été déterminée en quantifiant les signaux de chaque piste avec l'appareil phosphoimager (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) et en effectuant un rapport entre les oligonucléotides polyadénylés et le signal total.

Nous avons également tenté une autre méthode afin de limiter la longueur de la queue polyA, nous avons utilisé différentes combinaisons de dATP et de ddATP dans

la réaction de polyadénylation. Étant donné que les ddATP ne contiennent pas de groupement OH en 3', une fois qu'un ddATP est transféré à l'extrémité 3' du substrat, il est impossible pour la TdT d'incorporer d'autres nucléotides ((Kato et al., 1967; Ono, 1990; Roychoudhury et al., 1976). De cette façon, selon les proportions de dATP et ddATP utilisée, nous pouvons contrôler la longueur moyenne de la queue polyA. Cependant, même si cette méthode nous permettait de limiter la longueur maximale de la queue polyA, une grande proportion de substrats avait une queue polyA beaucoup trop courte (<5 nucléotides), donc nous avons abandonné cette méthode (résultats non montrés).

Essai des conditions optimisées pour la réaction d'extension d'amorce.

Maintenant que les conditions du choix de l'amorce, de l'extension d'amorce et de la polyadénylation ont été optimisées, il faut appliquer ces conditions à la réaction d'extension d'amorce modifiée pour mesurer le simple-brin télomérique. Les résultats sont présentés à la Figure 15. Toutes les extensions ont été effectuées avec l'amorce PolyT14(C/A)₃ à 30°C pendant 10 min, la polyadénylation avec 240U de TdT pendant 1min (sauf indication contraire) dans le tampon cacodylate. La polyadénylation sur DUP16 permet d'obtenir la même quantité de produits finaux si elle est effectuée pendant 1, 5 ou 15 minutes (Figure 15 pistes 3, 4 et 5). Des TRF provenant des souches WT, yku70Δ, mre11Δ et tel1Δ ont été purifiés et dosés spécifiquement en utilisant l'hybridation de type Southern et en comparant les signaux obtenus avec ceux obtenus avec un fragment télomérique d'une concentration connue. Les TRF ont été traités à l'Exonucléase I (+) pour abolir le simple-brin télomérique et ainsi servir comme contrôle négatif. Afin de s'assurer que le traitement Exonucléase I a été efficace, le même traitement a été appliqué aux oligonucéotides DUP16PolyA et

DUP16 avant la polyadénylation, ce qui devrait empêcher l'élongation. Comme on peut le voir aux pistes 2 et 6, le traitement ExoI ne semble fonctionner que partiellement, on peut voir l'absence de produit final ou une diminution de l'extension, mais pas une disparition complète. Les résultats sont ambigus avec les TRF, le traitement à l'ExoI semble diminuer le signal dans certains cas (pistes 10 et 14) mais dans d'autres, au contraire il y a un signal d'extension plus fort lorsque les échantillons sont traités à l'ExoI (pistes 8 et 12). Dans ce contexte, il est difficile d'évaluer si l'optimisation des étapes de l'extension d'amorces a permis d'améliorer la technique. Toutefois, comme précédemment (Figure 9) on note qu'avec les TRF de souche *yku70Δ* la technique permet une plus grande extension que dans les souches WT, ce qui concorde avec les résultats publiés dans la littérature (Gravel et al., 1998).

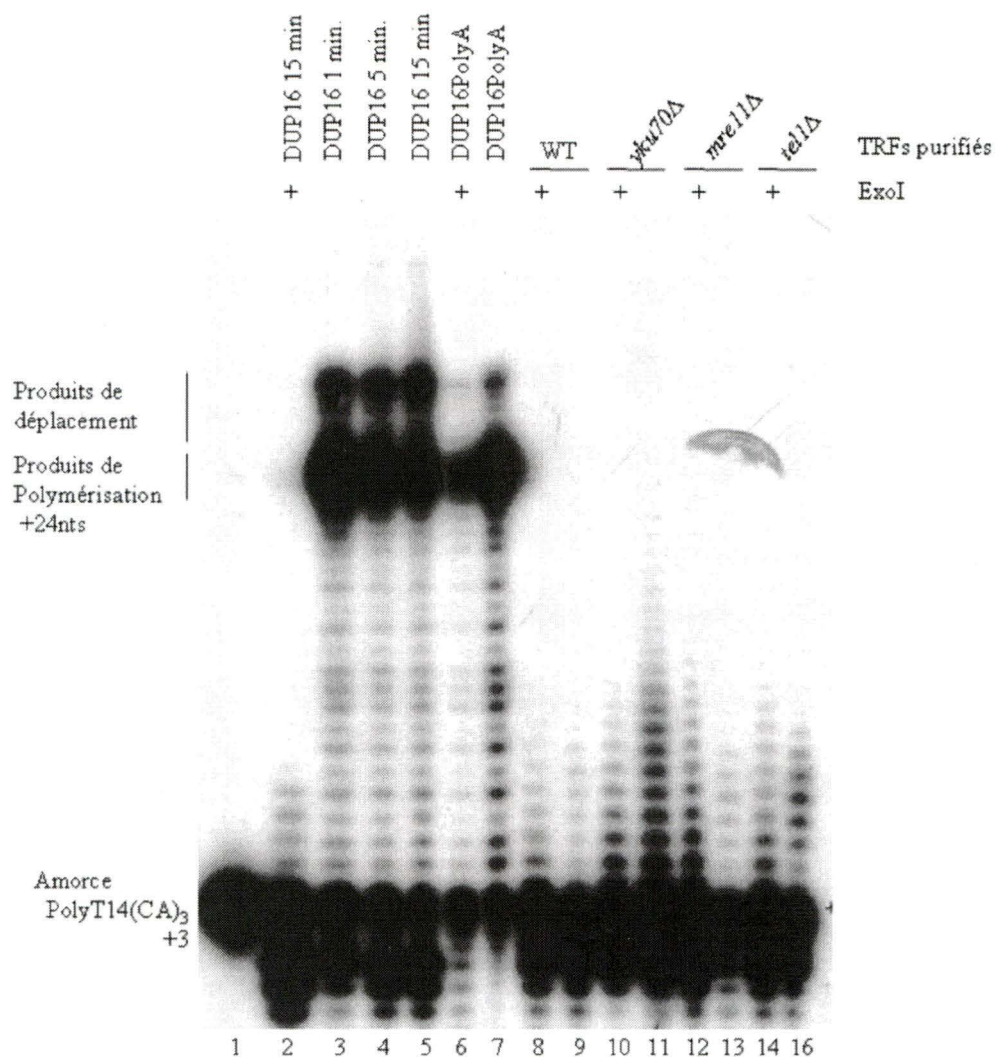


Figure 15: Extension d'amorce modifiée utilisant la TdT recombinante sur oligonucléotides et TRF purifiés.

Les réactions d'amorces modifiées ont été effectuées sur des substrats polyadénylés avec la TdT recombinante (240U) incubée à 37°C pour 1, 5 ou 15 min avec l'oligonucléotide DUP16 (pistes 2-7) et pour 1 min pour les échantillons avec TRF purifiés. La polyadénylation a été effectuée avec 1μM de dATP et le tampon cacodylate 5x (1M cacodylate de potassium (pH7.0), 0,5mM DTT, 5mM chlorure de cobalt). Selon le dosage spécifique, 0.025pmol de TRF provenant des souches WT, *yku70Δ*, *tel1Δ*, *mre11Δ*, a été utilisé, traité ou non à l'Exonucléase I (+), dans les pistes 8 à 16. L'extension d'amorce a été effectuée utilisant l'amorce PolyT14(C/A)₃ comme décrit dans la section Matériel et méthodes.

Afin d'obtenir un résultat plus concluant, il est essentiel que les contrôles négatifs fonctionnent parfaitement et que les traitements avec l'exonucléase abolissent le signal d'extension. Dans cette optique un second traitement a été utilisé pour abolir le simple-brin télomérique, les TRF purifiés ont été traités avec la nucléase Mung

Bean (NEB, Pickering, ON, Canada) qui est une enzyme endonucléase spécifique au simple-brin d'ADN ou d'ARN. Ce traitement peut donc servir de contrôle négatif. L'expérience a donc été répétée en utilisant ce nouveau traitement comme contrôle négatif en plus du traitement à l'Exonucléase I. Les oligonucléotides DUP16 et DUP16PolyA ont été traités avec l'Exonucléase I et l'endonucléase Mung Bean (Figure 16). Ces traitements ont été inefficaces puisqu'on détecte des produits d'extensions et même des produits d'extensions finales, particulièrement dans les échantillons traités avec l'Exonucléase I. Dans le cas de l'oligonucléotide DUP16PolyA les traitements à la nucléase semblent mieux fonctionner, ils réduisent grandement ou totalement la queue polyA et donc éliminent les produits d'extension (Figure 16 pistes 6 et 7). L'extension d'amorce effectuée sur TRF purifiés semble également s'effectuer même lorsque les TRF sont traités à l'Exonucléase I ou la Mung Bean et l'intensité de cette extension est constante. De plus, il est difficile d'observer une différence dans l'extension sur les TRF WT ou *yku70Δ*. En regardant l'ensemble de cette expérience (Figure 16), on remarque que dans tous les échantillons traités à la TdT (Pistes 2 à 4 et 8 à 9) l'amorce PolyT14(C/A)₃ est étendue d'environ 9 ou 10 nucléotides et cette extension semble constante, même lors des traitements avec nucléase. Il s'agit peut-être d'une extension non spécifique qui provient d'ADN contaminant dans la purification de la TdT. Pour tenter de régler ce problème l'enzyme TdT a été re-purifié en incluant une étape de précipitation des acides nucléiques. Même avec cette étape supplémentaire de purification, le résultat de l'extension d'amorce modifiée était le même : il y avait encore de l'extension non-spécifique (résultats non montrés). Le problème d'extension non-spécifique pourrait également provenir de la purification de TRF, nous avons donc tenté d'utiliser d'autres méthodes de purification.

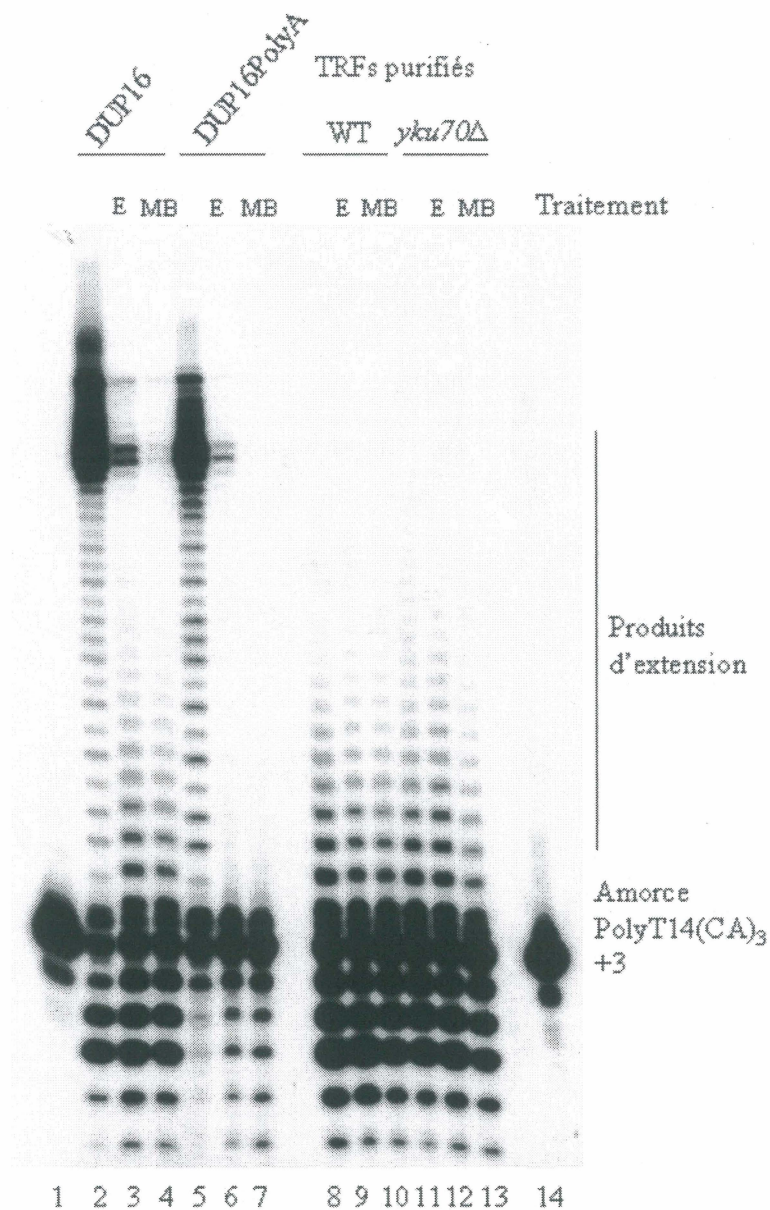


Figure 16: Extension d'amorce modifiée sur oligonucléotides ou TRF purifiés, traité ou non à l'Exonuclease I ou la nucléase Mung-Bean.

La polyadénylation et l'extension d'amorce ont été effectuées comme à la Figure 15. Les oligonucléotides contrôles ont été utilisés pour contrôler la polyadénylation et l'extension (voir Figure 9), mais également pour contrôler la digestion des nucléases qui a été faite avant la polyadénylation. Le DUP16 (pistes 2) a été traité à l'Exonuclease I (E) et à la Mung Bean (MB) pendant 16h à 37°C dans les pistes 3 et 4. Les mêmes conditions ont été utilisées pour le DUP16PolyA dans les pistes 5, 6 et 7. Les TRF purifiés (0.125pmol) de souche WT ou *yku70Δ* ont également été traité avec les nucléases avant la polyadénylation (piste 9, 10, 12 et 14).

Essai de purification des TRF par chromatographie d'exclusion diffusion.

La purification de TRF a toujours constitué une étape difficile, principalement à cause de la petite quantité de TRF récoltée par extraction de gel d'agarose. Évidemment, la proportion d'ADN correspondant aux TRF comparativement aux autres fragments d'ADN génomique est très petite, il faut donc avoir une grande quantité d'ADN de départ et un procédé de purification le plus efficace possible. La purification de TRF de cellules humaines a déjà été effectuée par chromatographie sur gel d'exclusion diffusion (Griffith et al., 1999). Cette méthode permettait un enrichissement d'environ 1000 fois et contenait 85 à 90% de séquences télomériques. Évidemment, dans les cellules de mammifères les TRF générés en coupant avec un mélange d'enzymes de restrictions sont beaucoup plus grands que le reste des fragments de restriction (de Lange et al., 1990). Il était donc possible pour les auteurs d'utiliser la chromatographie d'exclusion pour exclure les autres fragments de restriction et de séparer les TRF selon leurs tailles. Notre objectif était d'utiliser la même méthode, mais étant donné que nous voulions enrichir des TRF de levure, qui sont plus courts que la majorité des fragments de restriction, nous devions trouver une façon de séparer les fragments d'ADN de 1-1,5kb du reste des fragments, majoritairement de plus grandes tailles. Nous avons donc tenté d'utiliser le même procédé afin de purifier une plus grande quantité de TRF.

D'abord, pour évaluer la faisabilité de cette méthode de purification pour les TRF de levure, un marqueur d'ADN a été appliqué à une colonne de Sephacryl S-500 afin de déterminer la résolution de la séparation des fragments d'ADN selon leurs tailles. Le résultat de cette purification par chromatographie est illustré à la Figure 17, en A) est représenté le graphique de la densité optique en fonction du volume d'élution et en B) on visualise quels fragments d'ADN sont présents dans chaque fraction. Le

graphique de la purification montre qu'aux fractions 15 à 21 les fragments d'ADN qui ne pénètrent pas dans la matrice du gel sont élués et que par la suite d'autres fragments qui ont été retenus dans la matrice à cause de leurs tailles plus petites sont élués, conformément au principe de gel d'exclusion. La densité optique à 260nm corrèle bien avec la présence d'ADN (Figure 17, A et B), ainsi le contenu des fractions en ADN est analysé. On remarque qu'effectivement, les fragments les plus grands sont élués en premier et que les plus petits se retrouvent dans les fractions subséquentes. Pour nous permettre de purifier des TRF, cette méthode devrait séparer les fragments d'environ 1-1,2kb des fragments plus petits et plus grands. Cependant, l'élution des fragments de 1kb se fait dans les fractions 17 à 25, dans les mêmes fractions que les fragments beaucoup plus gros. Alors dans ce contexte, il est impossible de purifier efficacement les TRF, par contre, on note que les fragments d'ADN plus petits que 500pb sont efficacement isolés des fragments plus gros (Figure 17b fractions 24 à 34).

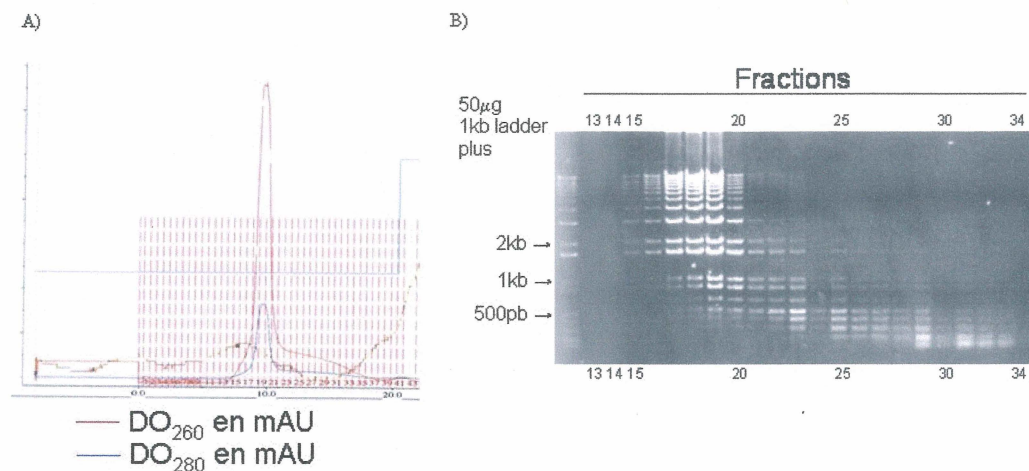


Figure 17: Chromatographie d'exclusion sur un marqueur d'ADN.

La chromatographie a été effectuée telle qu'elle a été décrite dans la section matériel et méthode, avec la résine Sephacryl S-500. 50µg du marqueur d'ADN, 1kb ladder plus (Invitrogen), ont été appliqués sur la colonne et les fractions (0.5ml) 13 à 34 ont été récupérées, l'ADN a été précipité et chargé sur un gel d'agarose 1%. A) Le graphique représente l'absorption à 260nm et 280nm (en milli-unité arbitraire mAU) lors de l'élution et permet de détecter les fractions contenant l'ADN. B) Le gel d'agarose a été coloré avec du bromure d'éthidium afin de détecter l'ADN.

À partir de ces résultats, nous avons élaboré une stratégie ayant pour but de purifier des TRF plasmidiques avec cette méthode de purification. L'objectif était de déterminer si l'investissement de temps et d'argent nécessaire à l'adaptation de cette méthode à la purification de TRF natif était justifié. Nous avons donc transformé des souches de levures avec le plasmide YLpFAT10 qui selon les données publiées (voir matériel et méthodes (Wellinger et al., 1993b)) devrait posséder des télomères équivalant à des télomères natifs pour ce qui est du simple-brin terminal. La structure terminale de ce plasmide permet de générer des TRF avec l'enzyme EcoRI. Ces TRF mesurent entre 250-300pb dans une souche WT et environ 50pb dans une souche qui a normalement les télomères courts (données non montrées). Ces tailles de TRF nous permettent donc de tenter leurs purifications avec la méthode de chromatographie sur colonne de filtration sur gel. Alors, l'ADN total de plusieurs souches d'intérêts a été extrait et digéré EcoRI pour générer des TRF natifs et plasmidiques (matériel et méthodes). L'ADN digéré a été appliqué sur la colonne de filtration sur gel. Une fois le chromatogramme obtenu, les fractions contenant l'ADN ont été identifiées et précipitées. L'ADN récupéré a été migré sur gel et une hybridation de type Southern nous a permis de visualiser les séquences télomériques (Figure 18A). Toutes les bandes visualisées par l'hybridation des séquences télomériques correspondent à des fragments de restriction de l'ADN génomique ou plasmidique. Ces fragments contiennent des séquences télomériques et ont été générés suite à la digestion avec EcoRI. Comme dans le cas d'un marqueur d'ADN, les fragments de restriction plus grands sont élués dans les premières fractions alors que les fragments plus petits sont retrouvés dans les fractions plus tardives. Afin d'analyser la répartition des fragments selon leurs tailles et selon la fraction d'éluion ou ils ont été recueillis, des fragments de différentes tailles ont été choisis pour la quantification. Donc des fragments de 7,

4,5 et 1kb ont été quantifiés, de même que la bande correspondant aux TRF plasmidiques (Figure 18A, TRF de YLpFAT10). Ces quantifications ont été portées sur un graphique (Figure 18B) où on peut constater que la majorité des TRF plasmidiques se retrouve dans les fractions 25 à 35 et que dans ces fractions il n'y a seulement qu'une faible proportion des fragments plus grands. Alors, il est possible par cette méthode de purification par chromatographie de récupérer la grande majorité des TRF plasmidiques d'une souche aux télomères courts, tout en excluant la plupart des autres fragments de restrictions. La même procédure a été effectuée pour les souches WT afin de déterminer dans quelles fractions se retrouve les TRF de YLpFAT10 et la purification a été faite avec les souches WT, *tel1Δ* et *yku70Δ*. L'étape suivante a été de faire la technique d'extension d'amorce modifiée sur ces TRF plasmidiques pour voir si cette méthode de purification, en plus de permettre de purifier plus de TRF à partir d'une plus grande quantité de TRF, permet également d'utiliser efficacement cette technique.

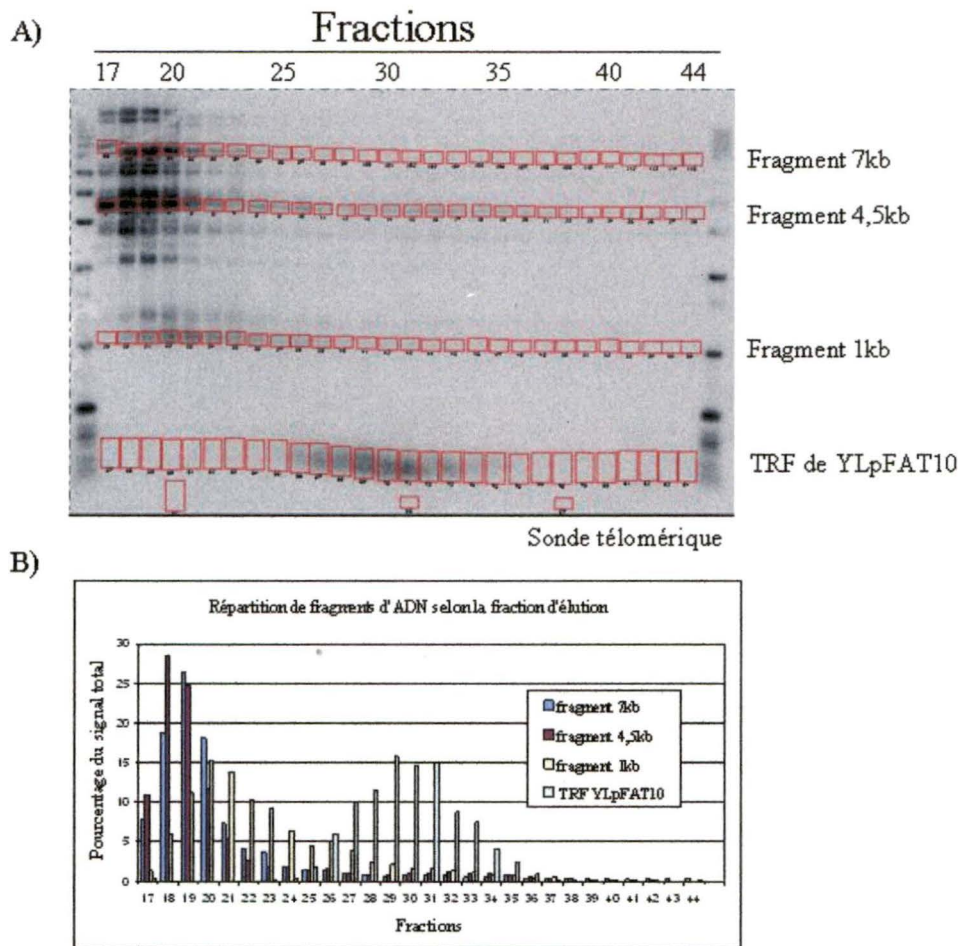


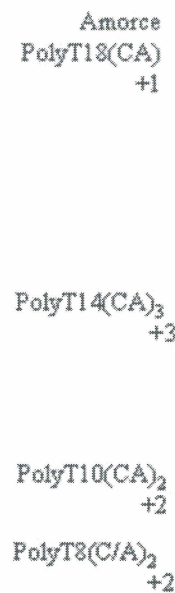
Figure 18: Purification de TRF plasmidiques d'une souche *mre11Δ* par chromatographie d'exclusion.

L'ADN total (10µg) d'une souche *mre11Δ* contenant le plasmide YLpFAT10 a été digéré et appliqué sur une colonne d'exclusion (voir matériel et méthode). Les fractions ont été récoltées, mis sur gel, et une hybridation de type Southern a été effectuée. A) La membrane hybridée avec une sonde télomérique. Les carrés rouges représentent les régions quantifiées avec le logiciel imagequant (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada). B) Un graphique illustrant les quantifications effectuées en A) pour montrer la répartition des fragments d'ADN selon les fractions. Les signaux obtenus pour un même fragment ont été additionnés et ensuite le signal pour chaque fraction a été rapporté sur le total.

Pour vérifier si cette méthode de purification est adéquate, l'extension d'amorce modifiée a été effectuée sur les TRF plasmidiques purifiés de souche WT et *tell1Δ* ainsi que sur les autres fractions de purification contenant les fragments de restriction non-terminaux pour servir de contrôle négatif (Figure 19). L'extension a été faite avec les différentes amorces décrites à la Figure 11 et dans les tableaux 2 et 3. Ces résultats sont présentés à la Figure 19, le contrôle DUP16PolyA montre que la

polymérisation avec la T4 ADN polymérase fonctionne bien. En comparant les produits d'extension obtenus en utilisant 0.04pmol de répétitions GT de TRF plasmidiques purifiés de souche WT ou *tel1Δ*, on note que peu importe l'amorce utilisée, il y a une extension d'intensité et de longueur similaire pour les deux souches. Par contre, cette extension est toujours présente dans les échantillons traités à l'Exonucléase I (pistes 10,14 et 16), et dans les fractions qui ne contiennent pas ou très peu de TRF (pistes 13-16). Toutefois, cette extension semble diminuer suite aux traitements. Également, il est important de noter que les amorces plus longues, PolyT14(C/A)₃ ou PolyT18(C/A), sont partiellement dégradées en 3', comme il est possible d'observer à la Figure 11. Finalement, la purification par chromatographie de filtration sur gel permet de purifier des TRF plasmidiques mais ceux-ci ne semblent pas plus efficaces comme substrat dans la technique d'extension d'amorce modifiée.

En résumé, les résultats obtenus permettent d'affirmer que les meilleures conditions sont d'utiliser une amorce avec plusieurs nucléotides d'alignement à température élevée, d'utiliser une grande quantité d'enzyme TdT pendant un court laps de temps et purifier les TRF par extraction de gel d'agarose.



La technique d'extension d'amorce modifiée a été réalisée comme à la Figure 12. Les amorces PolyT8(C/A)₂ (T8), PolyT10(C/A)₂ (T10), PolyT14(C/A)₃ (T14), et PolyT18(C/A) (T18) ont été utilisées pour faire l'extension sur TRF plasmidiques purifiées (0.04pmol) par chromatographie provenant de souche WT (W) ou *tel1Δ* (t). Les TRF de souche WT sont dans les pistes 3, 5, 7, 9 et 10 et les TRF de souche *tel1Δ* dans les pistes 4, 6, 8, 11 et 12. Les TRF des pistes 10 et 12 ont été traités à l'Exonucléase I pour éliminer le simple-brin télomérique. Les échantillons des pistes 13 à 16 ont subi les mêmes traitements et réactions que les pistes 9 à 12, cependant, au lieu des fractions de purification contenant les TRF plasmidiques, les autres fractions ont été rassemblées. Donc dans les pistes 13 et 14, les réactions ont été effectuées sur les fractions de purification contenant les fragments de restrictions non-terminaux de la souche TRF WT, et les pistes 15 et 16 de la souche *tel1Δ*. La même quantité d'ADN a été utilisée dans les pistes avec TRF purifiés que dans celles avec les autres fractions de purification. La piste 1 contient les amorces radiomarquées qui ont servi à l'extension. Selon l'amorce utilisée et son nombre de nucléotides d'alignement, l'extension débute à la position +1,+2 ou +3 relativement au début du simple-brin télomérique.

Chapitre 2

Étude des modifications d'expression génique suite à la perte du gène essentiel CDC13.

Préambule :

Le gène *CDC13* est un gène essentiel qui code pour la protéine Cdc13p qui est le facteur principal de la protection des télomères. En absence de cette protéine, ou de sa fonction de protection, les télomères sont rapidement dégradés. Récemment, notre laboratoire ainsi que deux autres, ont démontré qu'il est possible aux levures de vivre en absence de cette protéine essentielle dans différents contextes. Michel Larrivée dans le laboratoire de Dr. Wellinger a réussi à obtenir des cellules indépendantes de la télomérase et indépendantes de Cdc13p. Il est important de comprendre comment ces cellules font pour s'adapter à l'absence de capuchon télomérique. Nous voulons comprendre ce qui permet aux cellules de s'adapter et nous avons émis l'hypothèse que des changements d'expression de certains gènes pourraient permettre à une faible proportion des cellules de survivre sans Cdc13p.

Objectif spécifique :

Dans cette partie, nous voulons analyser par puce à ADN les différences d'expression génique dans les cellules survivantes sans Cdc13p. Les objectifs de cette expérience étant d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée en absence de la protéine essentielle Cdc13p et ainsi trouver les gènes qui sont importants pour le phénomène d'adaptation. Pour effectuer cette analyse, l'ARN total doit être extrait et la qualité de cette préparation doit être vérifiée afin de s'assurer que les résultats seront représentatifs des niveaux d'expressions dans les cellules. Ensuite, l'analyse des résultats de l'hybridation de la puce à ADN devrait permettre d'identifier les gènes dont l'expression est la plus modifiée dans les cellules et à partir de cette liste, une

sélection doit être faite selon les fonctions connues de ces gènes afin d'établir une liste des gènes les plus susceptibles d'avoir un impact dans les cellules $\Delta 13$. Une étape importante du projet est également de confirmer les résultats obtenus par hybridation sur puce à ADN en utilisant d'autres techniques, notamment l'hybridation de type Northern. Ainsi, l'expression des gènes présents sur la liste de gènes susceptibles identifiés par puce à ADN sera analysée par hybridation Northern en comparant l'expression dans les souches de survivants avec Cdc13p et en absence de Cdc13p.

Matériel et méthodes

Voir le chapitre 1 pour la description des techniques de culture de bactérie, culture de levure, manipulation d'acide nucléique, purification d'ADN de levure, radio marquage par extension d'amorce et gels de télomères.

Transformation de levure

Il est possible de transformer de l'ADN (plasmidique ou un fragment linéaire) dans les levures en utilisant la méthode LiAc/ssDNA/PEG (Gietz et Woods, 2006) à partir de colonies, d'une culture liquide saturée ou une culture liquide en phase exponentielle pour une efficacité grandement supérieure. Les cellules, après lavage, sont resuspendues dans 50uL d'une solution contenant de l'acétate de lithium (TE/LiAc : 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 0,1M acétate de lithium). À cette suspension, les solutions suivantes sont ajoutées : l'ADN à transformer (1 à 20µg), 50µg d'ADN simple-brin provenant du sperme de saumon pour servir de transporteur (ssDNA), et 300µL d'une solution de PEG 4000 40%. Les cellules sont ensuite incubées à 30°C pendant au moins 30 minutes et après à 42°C pendant 15 minutes.

Finalement, les cellules sont centrifugées et resuspendues dans l'eau, pour ensuite être étendues sur un Pétri de milieu sélectif approprié.

Souches

Les souches de survivants télomérase indépendant et de $\Delta 13$ ont été générées suite à des microdissections de la souche MLY100 (Larrivee et Wellinger, 2006) préalablement transformée avec *pcdc13-1*. Cette souche provient de la souche UCC3535 (*MATa/MAT α tlc1 Δ ::LEU2/TLC1 ade2-101/ade2-101 leu2- $\Delta 1$ / leu2- $\Delta 1$ lys2-801/lys2-801 ura3-52/ura3-52 trp1- $\Delta 63$ / trp1- $\Delta 63$ his3 $\Delta 200$ / his3 $\Delta 200$ DIA5-1/DIA5-1*) (Wellinger et al., 1996) dans laquelle la région codante (+57 à +2361) pour le gène *CDC13* a été remplacée par le gène *natR*. La souche *mms2 Δ* a été générée à partir de la souche MLY100 transformée avec *pcdc13-1* contenant l'allèle thermosenssible de *CDC13* afin de nous permettre de perdre graduellement les fonctions de la protéine Cdc13p, dans laquelle nous avons remplacé la région codante du gène *MMS2*, dont nous voulons étudier l'implication dans le phénomène d'adaptation, par le gène de résistance KanMx. Nous avons ensuite isolé par microdissection une souche avec le génotype *cdc13 Δ ::natR, tlc1 Δ ::LEU2, mms2 Δ KanMX, ade2-101/ade2-101 leu2- $\Delta 1$ / leu2- $\Delta 1$ lys2-801/lys2-801 ura3-52/ura3-52 trp1- $\Delta 63$ / trp1- $\Delta 63$ his3 $\Delta 200$ / his3 $\Delta 200$ DIA5-1/DIA5-1*. Les souches identifiées WT proviennent de la microdissection de la souche MLY100 et les allèles de type sauvage.

Plasmides

Les manipulations d'ADN comme les digestions avec enzyme de restriction, les ligations, les purifications de fragments ont été effectuées selon (Sambrook et al., 1989) ou selon le protocole des compagnies où les réactifs ont été achetés.

Les plasmides pDNL4, pHUG1, pMMS2 et pPTC2 ont été construits en amplifiant par PCR les gènes et en ajoutant des sites pour des enzymes de restriction.

Ces sites de restrictions permettent d'introduire ces inserts dans le plasmide pRS423 (Christianson et al., 1992). Les PCR ont été effectués avec 2,5U de polymérase Pfu (Catherine Desrosier, département de microbiologie et infectiologie), 20pmol de chaque amorce, 200µM de dNTP et une quantité variable (10-50ng) d'ADN génomique de levure. Le fragment contenant le gène *DLN4* a été amplifié en utilisant les amorces SpeI DNL4 FOR (GCTACTAGTGGGCTGAAGAGGAATGGTTG) et DNL4 bamh1 REV (ATAGGATCCCGTTTCAAATGGGACCACAG). Le fragment de 3,7kpb résultant contient 668pb avant le début de l'ORF jusqu'à 183pb après le codon de terminaison. Le fragment contenant le gène *HUG1* à partir de 684pb avant le début de l'ORF jusqu'à 219pb après la fin est de 1,1kpb et il a été amplifié avec les amorces SpeI HUG1 FOR (GCTACTAGTCCACGAGAAGTTGAAGAGGG) et HUG1 bamh1 REV (ATAGGATCCCGGATGACTTCCCAAATGG). Les amorces SpeI MMS2 FOR (GCTACTAGTGAGGGTTGTTGCAATTCCT) et MMS2 bamh1 REV (ATAGGATCCGAGGACCGTTGCAAGGATTG) ont été utilisées pour amplifier une région de 1,4kpb à partir de 661pb avant l'ORF jusqu'à 206 pb après la fin de l'ORF. Les fragments *DLN4*, *HUG1* et *MMS2* ont été digérés avec les enzymes SpeI et BamHI (NEB, Pickering, ON, Canada) pour être introduit par ligation avec la T4 ADN ligase (Catherine Desrosier, Université de Sherbrooke) dans le vecteur pRS423 digéré de la même façon. Le fragment contenant *PTC2* ainsi que 1024 pb avant l'ORF et 160pb après, d'une longueur de 2,6kb a été produit par PCR en utilisant les amorces PTC2 sacII FOR (ATCGTGCCGCGGGGCTCGAAATAACGAACACAG) et PTC2 bamHI REV (ATAGGATCCTTCAAGCGTCAAACACTGCATC). Ce fragment a été cloné en utilisant les enzymes SacII et BamHI et le vecteur pRS423 digéré avec les mêmes enzymes.

Les plasmides utilisés pour compléter sont pAZ1 (identifié pTLC1) (Singer et Gottschling, 1994) et pVL438 (identifié pCDC13), les plasmides vides utilisés sont pRS314 et pRS316.

Extraction d'ARN total

L'ARN total pour les puces à ADN (microarray) et pour les hybridations de type Northern, a été extrait selon la méthode utilisant des billes de verre (Rose, 1990). Brièvement, de 10 à 50ml de culture de levure en milieu de phase exponentielle (DO = 1.0) est centrifugée à 2000 x g. Le culot de cellules est ensuite lavé 2 fois dans le tampon LETS (0,1M chlorure de lithium, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% SDS) à 4°C et il est ensuite resuspendu dans 300uL de LETS et 300 de phénol/chloroforme. Des billes de verre sont ensuite ajoutées jusqu'à ce que le niveau des billes atteigne 2mm du ménisque et la paroi des cellules est brisée alternant 30 sec de vortex et 30 sec de repos sur glace. Cette routine est répétée environ 10 fois et ensuite le liquide est récupéré des billes, les billes sont lavées avec 200mL de LETS froid et tout le liquide récupéré est centrifugé 5min à 13 000 x g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée, et 2 extractions au phénol-chloroforme suivies d'une extraction au chloroforme sont effectuées de la même façon en récupérant la phase aqueuse à chaque fois. L'ARN présent dans la phase aqueuse est précipité en utilisant 2 volumes d'éthanol 100% additionnés de 0,5M de chlorure de lithium. Le culot est lavé dans l'éthanol 70%, séché, et resuspendu dans de l'eau bidistillé traité au DEPC (Sambrook et al., 1989). L'ARN total est alors quantifié avec le spectrophotomètre.

Buvarlage de type Northern

Le buvardage de type Northern est effectué pour transférer de l'ARN sur une membrane de nitrocellulose afin de l'hybrider avec une sonde spécifique. Cette technique peut être utilisée pour évaluer l'expression d'un gène en utilisant l'ADN

total d'une souche et en hybridant avec une sonde spécifique pour le gène à étudier. Brièvement, la technique consiste à faire un gel d'agarose formadehyde 6 %/MOPS 1x (10x : 0,4M d'acide morpholinopropanesulphonique, 0,1M acétate de sodium, 10mM EDTA, pH ajusté à 7.2) et à faire séparer 20-30µg d'ARN total (tampon de chargement : 50%(v/v) formamide, 1x MOPS, 6% formaldéhyde) dans du tampon MOPS 1x. L'ARN est ensuite transférée sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) par capillarité (voir Hybridation de type Southern) en utilisant une solution de 20xSSPE (3,6 M chlorure de sodium, 0,2 M phosphate de sodium dibasique, 20mM EDTA, pH 7,7) ou une solution de 10x SSC (1,5M chlorure de sodium, 0,15M citrate de sodium). Une fois l'ARN transférée elle est pontée à la membrane par rayonnement UV. L'hybridation avec une sonde radio marquée s'effectue à une température approprié (65°C), après 1h de pré-hybridation, dans une solution d'hybridation (5x SSPE, 5x Denharts, 0.5% (v/v) SDS, 20mg/mL d'ADN de sperme de hareng). La membrane est ensuite lavée (2x SSPE, 0,1% (v/v) SDS) et exposée dans une cassette de détection pour le *PhosphorImager* (Storm Imager). Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée traitée au DEPC.

Buvardage de type Southern

Le buvardage de type Southern permet le transfère d'ADN sur une membrane de nitrocellulose et à l'hybridation spécifique de l'ADN présent sur cette membrane avec une sonde. Ce protocole a été effectué selon des méthodes établies (Reed et Mann, 1985; Sambrook et al., 1989; Southern, 1975) et a été principalement utilisé pour caractériser les télomères (Chapitre 1, gel de télomères).

Croissance par dilution en série (spot tests)

Les souches à étudier sont cultivées en milieu liquide jusqu'en phase exponentielle (environ une concentration de 1×10^7 cellules/mL) et des dilutions d'un

facteur de 10 sont faites à partir de cette culture pour obtenir des concentrations de 1×10^7 cellules/mL jusqu'à 1×10^3 cellules/mL. Une petite quantité (3-5 μ L) de ces dilutions est déposée sur un milieu solide qui peut contenir un agent endommageant l'ADN pour comparer les souches sur leurs sensibilités à de tel agent.

Analyse transcriptionnelle par puce à ADN (microarray)

Toutes les manipulations faites à partir de l'ARN total ont été effectuées par la plateforme de génomique fonctionnelle du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill (<http://www.genomequebecplatforms.com>) selon les protocoles et procédures en vigueur (Résumé à la Figure 20). Les résultats ont été obtenus à partir site internet NANUQ (<https://genomequebec.mcgill.ca/nanuq>) et ont été analysés à partir des outils fournis sur ce site et selon les directives contenues dans les tutorats. Nous avons utilisé la micropuce « GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array » d'affymetrix.

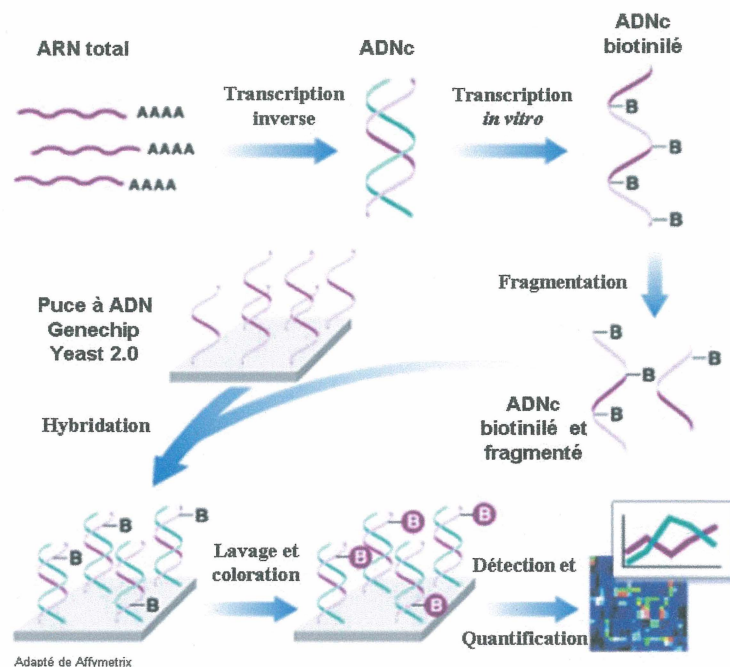


Figure 20 : Procédé utilisé pour l'expérience d'hybridation sur puce à ADN.

D'abord, l'ARN total est extrait d'une culture de cellules en phase exponentielle. L'ARN est ensuite converti en ADNc double-brin par une réaction de transcription inverse, ces ADNc sont stables et peuvent être conservés. Pour effectuer l'hybridation sur puce, l'ADNc est converti en ARN par une

réaction de transcription *in vitro* en incluant des molécules d'uracile liées à la Biotine. Donc l'ARNc est biotinylé et ensuite fragmenté en petit fragment de 30-400 bases pour être hybridé sur la puce. Après des étapes de lavage, les ARNc hybridés à la puce sont détectés avec une molécule fluorescente qui colle à la biotine (streptavidine liée au fluorophore Cy5). Finalement, la puce est balayée avec un laser et l'information est transférée dans un ordinateur pour la quantification des signaux et ainsi mesurer le niveau d'expression des ARNm.

Génération de survivants indépendants de la télomérase (Lundblad et Blackburn, 1993)

Une levure diploïde hétérozygote qui possède un allèle *TLC1* deleté, est sporulée et les spores sont séparés par microdissection (Rose, 1990). Étant donné que chaque délétion est effectuée en intégrant un marqueur de sélection à la place du gène d'intérêt, il est possible de sélectionner les spores qui contiennent les mutations recherchées. Donc, selon les marqueurs de délétion, les spores possédant l'allèle deleté (ex : *TLC1::LEU2*) en combinaison avec d'autres mutations, si nécessaire, sont identifiés. L'identification des clones est effectuée en vérifiant la croissance de chaque spore sur milieu sélectif afin de déterminer la ségrégation des allèles. Une fois les spores possédant le bon génotype sont identifiés, ces spores sont poussés sur milieu solide en effectuant plusieurs passages. Pour les souches sans télomérase active (ex : *tlc1Δ*), on compte généralement environ 20 générations lorsqu'il y a développement d'une colonie (1-2mm de diamètre). Normalement, on observe un arrêt de croissance normal et une accumulation de petites colonies après 3-4 passages. Sur de telles boîtes, on peut récupérer des colonies de taille normale qui ont des cellules survivantes qui maintiennent leurs télomères de façon alternative, de type I ou II. Après 5 passages (100 générations), les colonies de survivants sont poussées en liquide pour extraire l'ADN et identifier leur type de survivants par gel de télomère et hybridation de type Southern.

Génération de survivants qui vivent et prolifèrent en absence de Cdc13p (Larrivee et Wellinger, 2006) (Figure 21).

À partir de souches survivantes qui maintiennent leurs télomères de façon alternative, il est possible d'isoler des clones qui poussent en absence de Cdc13p. Une souche possédant une délétion du gène *CDC13*, complémenté par un plasmide contenant l'allèle *cdc13-1^{ts}*, ainsi qu'une délétion du gène *TLC1*, est utilisé pour générer des survivants de type I et de type II à 23°C qui est une température permissive pour l'allèle *cdc13-1* (Nugent et al., 1996). Ces survivants peuvent être poussés sur milieu solide (YEPD) pour plusieurs passages, à des températures de plus en plus restrictives pour *cdc13-1* (26, 30, 34 et 37°C) et de cette façon il est possible à chaque passage d'identifier des colonies qui peuvent pousser à cette température. Finalement, une colonie qui pousse à 37°C est striée sur milieu contenant du FOA (Boeke et al., 1987) qui ne permet pas aux cellules de conserver le plasmide *cdc13-1* puisque celui-ci contient également le gène *URA3*. Après 1 ou 2 passages sur milieu avec du FOA, la souche est considérée comme « $\Delta 13$ » et n'exprime plus, sous aucune forme, la protéine CDC13p. Alternativement, les souches de départ poussées à 23°C en milieu liquide sont diluées et incubées à 30°C pour 24-48h, ensuite une quantité de cellules est déposée sur milieu solide et incubé à 37°C. Les colonies obtenues à 37°C sont striées sur milieu contenant du FOA et les colonies obtenues sont considérées télomérase et CDC13p indépendantes. Il est également possible de générer des souches « $\Delta 13$ » à partir de souches possédant la télomérase qui maintiennent leurs télomères de façon normal (WT).

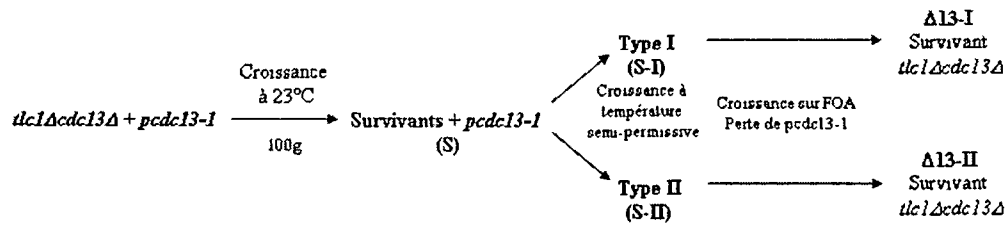


Figure 21 : Génération de cellules indépendantes de Cdc13p à partir de survivants de type I et de type II

Adapté de (Larrivee et Wellinger, 2006),

Détermination de la fréquence d'apparition de cellules capables de survivre en absence de Cdc13p (Larrivee et Wellinger, 2006)

Cet essai permet de déterminer la fréquence de l'événement (ou de la succession de plusieurs événements) qui permet à une cellule de survivre en absence de Cdc13p. À partir d'une souche dans laquelle *CDC13* est remplacé par un gène marqueur et qui a le plasmide *pcdc13-1*, il faut déterminer la fréquence à laquelle une cellule exposée à une température restrictive pour *cdc13-1^{ts}* (30°C) sera en mesure de s'adapter pour survivre et proliférer en absence de Cdc13p. Les cellules sont d'abord poussées à 23°C en liquide jusqu'à saturation et ensuite diluées (environ à 0.2 cellules/mL) et exposées à 30°C pendant 24h. Après cette exposition, une quantité donnée de cellules (déterminée par densité optique ou par compte de cellule à l'aide d'un hémacytomètre) est étendue sur deux Pétris de milieu solide qui sont incubés à 23°C (généralement 1×10^3 cellules/Pétri) et à 37°C. (Généralement $1 \times 10^{8-9}$ cellules/Pétri) pour plusieurs jours. D'abord la fréquence de survie est déterminée en comptant le nombre de colonies qui poussent sur les Pétris à 23°C divisé par la quantité de cellules totales qui a été étendue sur Pétri. Ensuite la fréquence d'adaptation à la perte de Cdc13p est calculée en comptant les colonies qui poussent à 37°C sur la quantité total de cellules sur le Pétri et on divise ce taux par la fréquence de survie. De cette façon, la fréquence d'adaptation tient en compte seulement les

cellules qui ont survécu à l'exposition à température restrictive. Les mêmes résultats sont obtenus si des Pétris contenant du 5-FOA sont utilisés au lieu de l'exposition à 37°C pour se débarrasser des fonctions de Cdc13p.

Test de fluctuation (Luria et Delbruck, 1943)

Ce test est effectué afin de déterminer le taux d'adaptation à la perte de Cdc13p par cellule par division cellulaire. Le même type de souche est nécessaire que pour détermination de la fréquence d'apparition de cellules capable de survivre en absence de Cdc13p.

Pour une même souche, 20 cultures en milieu liquides sontensemencées à partir d'une colonie et poussées à 23°C jusqu'à saturation. Ces cultures sont ensuite diluées (environ à 0.2x10⁷cellules/mL) et incubées à 30°C pour 24h. Pour chaque culture, la concentration de cellules est déterminée et une quantité fixe (variant de 1x10⁴ à 3x10⁵ cellules/Pétri) est déposée sur un Pétri de milieu solide et incubée à 37°C, ceci pour chaque culture (20). Après plusieurs jours (4-5), la quantité de Pétri sur lesquels ont poussé des colonies est comptée. Le calcul du taux d'adaptation est effectué selon l'équation de Luria et Delbruck :

$$A = \frac{-\ln\left(\frac{N_0}{N}\right)}{M}$$

N_0 = Nombre d'expérience ou il n'y a aucune cellule adaptée (Nombre de Pétri sans colonies)

N = Nombre d'expérience ou il y a des cellules adaptées (Nombre de Pétri avec colonies)

A = Taux d'adaptation par cellule par division

M = Nombre de cellule dans chaque expérience (quantité de cellules par plate)

Les tests de fluctuation ont été effectués sur différentes souches portant des mutations ou des plasmides de surexpression de façon à faire varier l'expression de certains gènes et d'observer l'effet de ces différences d'expression sur le taux d'adaptation à la perte de Cdc13p.

Résultats

Afin de faciliter l'interprétation des résultats de l'hybridation sur puce à ADN, nous avons décidé d'utiliser des souches survivantes adaptées à la perte de Cdc13p mais qui par la suite ont été transformées avec un plasmide codant pour *TLC1*. Les souches à comparer différaient les unes des autres par le fait qu'elles contenaient ou non le gène *CDC13* (Figure 22). Bref, nous avons utilisé trois souches identiques à celles utilisées dans la Figure 23 et la Figure 24A) (Voir matériel et méthodes section « Génération de survivants qui vivent et prolifèrent en absence de Cdc13p »).

Nous allons donc comparé les souches avec le génotype suivant : $\Delta 13\text{-I } tlc\Delta cdc13 \Delta + pTLC1 + pCDC13$ avec la souche $\Delta 13\text{-I } tlc\Delta cdc13 \Delta + pTLC1$ (voir Figure 22)

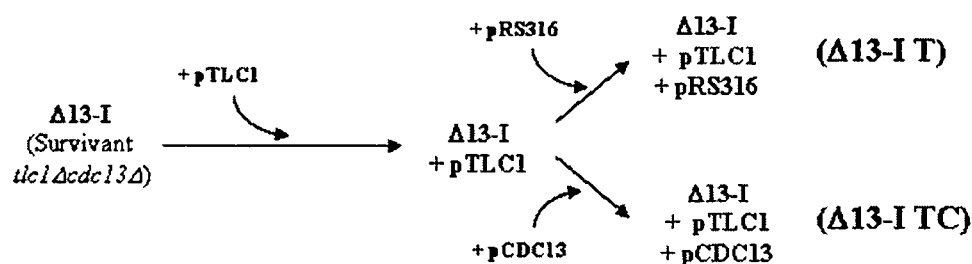


Figure 22 : Génération de souches à utiliser pour l'analyse de l'expression génique.

Trois clones indépendants d'une souche $\Delta 13\text{-I}$ (voir Figure 21, Matériel et méthodes) ont été transformés avec le plasmide pTLC1 et ensuite 1 clone a été transformé soit avec le plasmide vide (pRS316) ou avec le plasmide pCDC13. Les souches ainsi générées ont été nommées $\Delta 13\text{-I T}$ et $\Delta 13\text{-I TC}$.

Caractérisation et vérification des souches à utiliser

D'abord, les structures télomériques des souches $\Delta 13$ possédant *TLC1* sur plasmide ont été analysées par gel de télomères avec une sonde télomérique contenant des répétitions GT/CA (Figure 23). Les souches ont été produites en adaptant à la perte de Cdc13p, des survivants de type I et II et ensuite en réintroduisant sous forme de plasmide le gène *TLC1* afin d'obtenir une structure terminale normale et un plasmide vide ou pCDC13 pour contrôler l'absence ou la présence de Cdc13p (Figure 22).

Les survivants de type I sont caractérisés par l'amplification des Y' et de courts TRF, alors que les type II par l'hétérogénéité des TRF qui apparaissent sous forme de bandes (Lundblad et Blackburn, 1993) ; comme on peut l'observer dans les pistes 4 et 5 de la Figure 23. Les cellules $\Delta 13$ -I T ont également des séquences Y' amplifiées (Figure 23, pistes 6, 8, 9 et 11) mais on note une absence de TRF pour tout les clones. Lorsque l'on réintroduit *CDC13* sur un plasmide ($\Delta 13$ -I TC), les séquences Y' sont toujours amplifiées, mais on note une réapparition des signaux correspondant aux TRF et ces TRF apparaissent courts (Larrivee et Wellinger, 2006). Lorsque la télomérase est fonctionnelle, ces TRF redeviennent une longueur normale après un certain nombre de générations (Larrivee et Wellinger, 2006) (Figure 23). Ce phénomène explique la différence observée dans la longueur des TRF pour le clone 3b comparativement aux clones 2.2 et 2.3 ; le clone 3b a eu une télomérase fonctionnelle plus longtemps que les autres clones (150 g ou 50 g) ce qui explique que ses TRF sont légèrement plus longs. Les TRF des clones $\Delta 13$ -I avec pTLC1 2.2 et 2.3 auxquelles on a réinséré *CDC13* sont plus long que ceux des survivants de type I mais plus court que les WT, ils sont en voie d'être rallongés au fil des générations par la télomérase. Le clone $\Delta 13$ -II avec pTLC1 possède également les caractéristiques des survivants de

type II, soit une grande hétérogénéité des séquences télomériques sauf qu'en absence de *CDC13*, on note également une amplification des séquences Y' (Figure 23, pistes 5, 13 et 14). Lorsque *CDC13* est réintroduit, la structure des télomères retourne à la normale (Figure 23 piste 14). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Michel Larrivée avec ses clones de $\Delta 13$ en présence de télomérase active (Larrivee et Wellinger, 2006). Il est important de noter que la télomérase active n'influence pas la structure télomérique des cellules $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II. De plus, dans les cellules $\Delta 13$, la présence de *TLC1* n'affecte pas les comportements par rapport à la réponse aux points de contrôles (Larrivee et Wellinger, 2006). Les clones de $\Delta 13$ -I + pTLC1 et de $\Delta 13$ -II + pTLC1 ont une structure terminale conforme à celle observée précédemment et la réintroduction de *CDC13* rétablit des télomères normaux en présence de pTLC1.

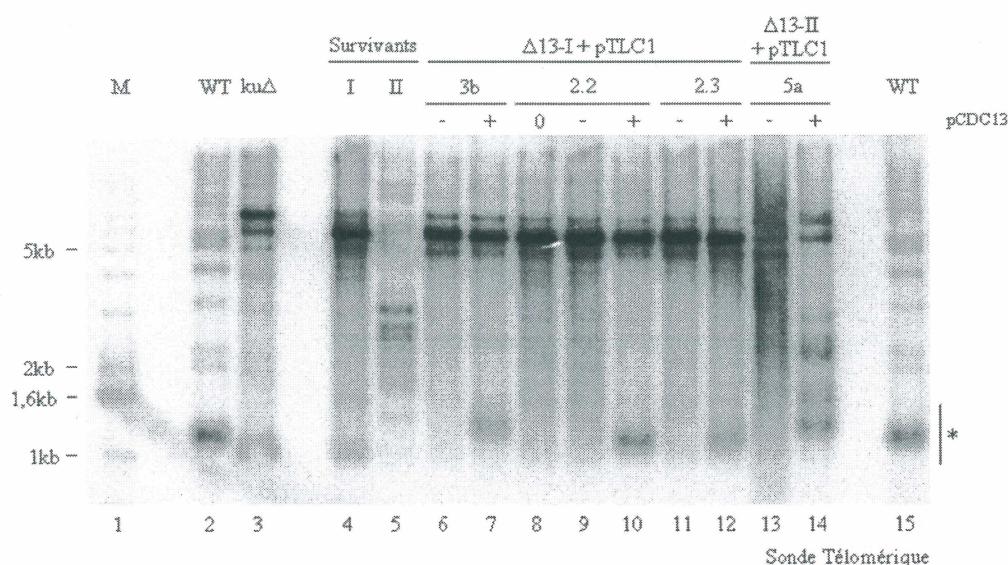


Figure 23: Analyse des télomères des souches $\Delta 13$ avec *TLC1* et *CDC13* réintroduit

À partir de deux clones indépendants (*tlcΔ cdc13 Δ + pcdc13-1*), des survivants de type I et II ont été générés, ensuite ces survivants ont été adaptés en $\Delta 13$ (voir section Matériel et méthodes). Ensuite, les plasmides contenant *TLC1* (+ pTLC1) et *CDC13* (+) ou pRS316 (-) ont été réintroduits, dans le cas de la souche 2.2 identifiée 0, aucun plasmide n'a été introduit et la souche a été cultivée sur milieu riche. Les échantillons d'ADN ont été extraits environ 50 générations après la réintroduction pour les clones 2.2 et 2.3 et après environ 150 générations pour le clone 3b. L'ADN a été digéré par l'enzyme XhoI (matériel et méthodes), des souches contrôles de type sauvage (WT) et *kuΔ* ont été utilisées. Trois

clones différents ont été utilisés pour les souches $\Delta 13$. La piste 1 contient le marqueur de poids moléculaire « 1kb ladder ». Les pistes 2 et 15 contiennent le contrôle WT qui est une souche avec des télomères protégés et maintenu par la télomérase de façon classique et le contrôle $ku\Delta$ dans la piste 3 sert d'exemple d'une souche avec les TRF courts. Des survivants classiques sans télomérase ont été utilisés dans les pistes 4 et 5 pour contrôler les profils des survivants de type I et II. Les pistes 6 à 13 contiennent l'ADN isolé de souches $\Delta 13$ obtenu à partir de survivants de type I sans Cdc13p pour 3 clones, dans lesquelles ont été insérés les plasmides indiqués. Dans les pistes 13 et 14 les cellules ont été obtenues à partir d'un survivant de type II. * Fragments de restriction terminaux (TRF)

Les cellules $\Delta 13$ de type I ou II sont très sensibles aux agents qui endommagent l'ADN, possiblement parce que ces cellules ont un défaut dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, les cellules n'arrêtent pas le cycle cellulaire pour permettre aux mécanismes de réparation de réparer les dommages et pour les cellules qui continuent leurs divisions, ces dommages à l'ADN peuvent être létaux. Ces résultats ont été obtenus par Michel Larrivée en vérifiant la sensibilité des $\Delta 13$ au MMS et au HU (Lawley, 1989), en plus de vérifier la phosphorylation de la protéine Rad53p qui est une protéine essentielle au fonctionnement des points de contrôle (Larrivée et Wellinger, 2006; Sanchez et al., 1996). L'objectif est donc de vérifier si les clones $\Delta 13$ générés ou pTLC1 à été réintroduit sont également sensibles aux agents endommageant l'ADN afin de s'assurer que ces clones sont idéaux pour l'expérience de puce à ADN. Des dilutions en séries ont été effectuées pour les différents clones (voir matériel et méthodes) et les dilutions ont été appliquées sur des milieux appropriés contenant ou non, différentes concentrations de MMS. Les cellules $\Delta 13$ + pTLC1 sont sensibles aux agents qui endommagent l'ADN comparativement aux mêmes cellules auxquelles pCDC13 a été ajouté ou aux cellules jamais adaptées à la perte de Cdc13p. En effet, on observe une perte de viabilité en présence de MMS pour les $\Delta 13$ -I + pTLC1 et $\Delta 13$ -II + pTLC1 (Figure 24A et B). Une sensibilité semblable est détectée lorsque les cellules sont mises en présence d'hydroxyurée (HU), un autre agent qui cause des dommages à l'ADN. Par contre, la sensibilité semble plus

A)

tlc1Δ cdc13Δ Type I
+ pTLC1 clone 3b

+ *pcdc13-1*

pcdc13

Sc-U-T

0.001% MMS

0.005% MMS

25mM HU

50mM HU

B)

+ *pcdc13-1*

tlc1Δ cdc13Δ Type II
+ pTLC1 clone 5a

pcdc13

Yc-U-T

0.001% MMS

0.005% MMS

Les souches survivantes (*tlcΔ cdc13 Δ* + *pcdc13-1*) de type I (A clone 3b) et II (B clone 5a) ont été adaptées à la perte de Cdc13p (voir matériel et méthode) et ensuite transformées avec un plasmide pTLC1 et le plasmide pCDC13 (+) ou le plasmide vide (-). À partir de ces souches, des cultures liquides en phase exponentielle, obtenues à 23°C, ont été diluées en série (1/10) de façon à obtenir quelques cellules dans la dilution la plus grande. Quelques microlitres de ces dilutions ont été apposés sur des milieux de culture solide contenant, ou non, du MMS un agent qui endommage l'ADN. La sensibilité à l'hydroxyurée (HU), un agent qui cause des cassures double-brin près des fourches de réplication, a également été vérifiée pour le clone 3b. Tous les Pétris contiennent un milieu synthétique sans tryptophane et sans uracile pour conserver la sélection pour les plasmides.

Le principe de l'analyse de l'expression génique par micropuce consiste à détecter la présence d'ARNm dans des cellules par l'hybridation des molécules d'ARN modifiées pour qu'on puisse les détecter sur une puce à ADN. La puce à ADN contient des séquences d'ADN correspondant à des gènes d'intérêts et ainsi si un transcrit est présent, il s'hybridera à la séquence correspondante et son niveau

d'expression pourra être mesuré. Ainsi, pour la levure, il est possible de détecter le niveau d'expression de tous les transcrits d'ADNm dans une condition donnée. Dans le contexte de notre étude, nous voulions comparer l'expression globale des souches $\Delta 13-I T$ avec les souches $\Delta 13-I TC$ de façon à trouver des différences d'expression dans les cellules sans *CDC13*. Plus de détails sur la méthode utilisée sont donnés dans la section voir Matériel et méthodes (Voir Figure 20 : Procédé utilisé pour l'expérience d'hybridation sur puce à ADN).

Évaluation des résultats de l'hybridation sur micropuce.

Maintenant que les souches à utiliser ont été caractérisées et qu'elles ont les mêmes phénotypes que les souches générées suite aux expériences de Michel Larrivée, nous en avons extrait l'ARN total (Voir matériel et méthode). La qualité de l'ARN extrait a été vérifiée (Christian Prud'homme, Données non montrées) et les échantillons ont été envoyés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill.

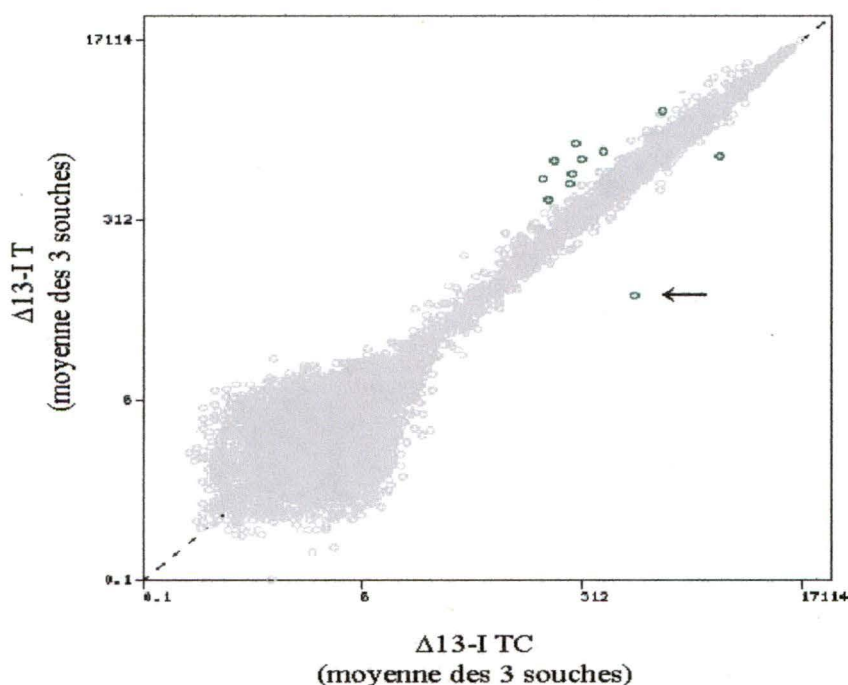


Figure 25: Graphique comparatif des signaux moyens pour les cellules avec ou sans *CDC13*

Chaque cercle représente un locus et le niveau d'expression moyen est porté sur le graphique. En Ordonné, sont rapportées les moyennes des souches sans *CDC13* et en Abscisse se sont les moyennes des souches avec *CDC13*. Si le niveau d'expression d'un gène ne change pas, son cercle sera exactement sur la ligne médiane, plus le niveau d'expression est modifié plus le cercle est éloigné de la ligne. Les cercles verts sont les gènes dont l'expression est modifiée de plus ou moins 2,5 fois si on compare les souches avec ou sans *Cdc13p*.

Les profils d'expression des souches sans *CDC13* et avec *CDC13* sont très similaires et il y a très peu de gènes dont l'expression est modifiée de plus ou moins 2 fois (Figure 25). À l'exception du gène *CDC13* (flèche ←), il y a peu de variation dans l'expression des gènes et surtout pour les quelques gènes dont l'expression est modifiée, le changement du niveau d'expression n'est pas très important dans les cellules $\Delta 13$ -I T. Les analyses statistiques ont été effectuées selon des méthodes pré-établies d'analyse de résultats des puces Affimetrix, notamment l'analyse RMA (Robust Multi-array Average) et MAS 5.0 selon les instructions fournies sur le site internet NANUQ (<https://genomequebec.mcgill.ca/nanuq>) (Bolstad et al., 2003; Irizarry et al., 2003) (Boes et Neuhauser, 2005). Selon une analyse RMA, on peut identifier 22 loci dont l'expression est augmentée de 2 fois ou plus dont 4 ORF non caractérisés, 1 protéine hypothétique, 2 ORF dont les fonctions des protéines sont inconnues et un ORF incertain. Parmi ces loci, certains pourraient être impliqués dans le processus cellulaires qui nous intéresse. Toutefois, peu d'information est disponible sur ces loci, pour les ORF non caractérisés, il s'agit d'ORF indentifier par outils informatique mais dont l'existence n'a pas été démontré expérimentalement. Un ORF codant pour une protéine hypothétique indique qu'il n'y a aucune information disponible sur l'existence d'une protéine codée par cet ORF, tandis pour les ORF dont les fonctions des protéines sont inconnues, les protéines existes mais non pas été caractérisées. Nous avons également effectué une analyse MAS5 avec une probabilité (p) de 0.01, il y a 50 gènes dont la probabilité que l'expression soit augmentée, même

très faiblement dans les cellules $\Delta 13$ -I T. Parmi ces loci dont l'expression était modifiée, une multitude n'avait aucun lien direct ou indirect évident avec les processus cellulaires qui nous intéressent. Donc, nous avons analysé les résultats obtenus afin d'isoler les gènes qui pourraient être impliqués dans le phénomène que nous voulons étudier. Nous avons cherché des gènes qui étaient impliqués dans les points de contrôle, dans la réparation des dommages à l'ADN, dans la réplication et dans la maintenance des télomères, dont l'expression était modifiée en absence de Cdc13p. Nous avons choisi certains de ces gènes d'intérêts pour confirmer les résultats de l'hybridation de la puce à ADN (Tableau 4). Nous avons choisi ces gènes parce qu'ils ont une meilleure probabilité d'être impliqués dans les processus qui nous intéressent que des gènes inconnus ou des gènes ayant des fonctions cytoplasmiques ou membranaires, par exemple. Toutefois, d'autres gènes pourraient également être impliqués dans l'adaptation à la perte de Cdc13p que ceux que nous avons sélectionnés, mais nous avons commencé par vérifier ceux qui nous semblaient les plus prometteurs.

Gène	Nom systématique	Expression relative <i>cdc13Δ/CDC13</i>	Informations sur le gène ou la protéine
<i>HUG1</i>	YML058W-A	2.97x	La protéine impliquée dans la voie de point de contrôle dépendante de Mec1p en réponse aux dommages à l'ADN ou à l'arrêt de la réplication. La transcription est induite par les dommages à l'ADN. Non essentielle.
<i>DNL4</i>	YOR005C	1.89x	La protéine est une ADN ligase requise pour la jonction de brin non-homologue (NHEJ) et elle forme un hétérodimère qui nécessite Lif1p. La protéine catalyse la ligation en complexe avec Lif1p et Nej1p. Non essentielle.
<i>RAD59</i>	YDL059C	1.27x	La protéine est impliquée dans la réparation des cassures d'ADN double-brin par la recombinaison et par appariement simple-brin. Elle permet l'appariement d'ADN simple-brin et est un homologue de Rad52p.
<i>PTP2</i>	YOR208W	1.21x	Protéine phosphatase, spécifique aux tyrosine, impliquée dans l'inactivation des « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) pendant les modifications d'osmolarité. Elle déphosphoryle Hog1 et régule sa localisation. La protéine Ptp2p est présente dans le noyau.
<i>MMS2</i>	YGL087C	1.11x	Impliqué dans la voie de réparation post-réplication, plus particulièrement dans la voie fiable (« error-free »). La protéine forme un complexe avec Ubc13p qui possède une activité de conjugaison d'ubiquitine. Ptp2p coopère avec les protéines Rad18p et Rad51p.
<i>RPB9</i>	YGL070C	0.87x	La protéine est la sous-unité B12.6 de l'ARN polymérase II, elle contacte l'ADN et est impliquée dans la maintenance des télomères.
<i>MCD1</i>	YDL003W	0.87x	La protéine est essentielle et est importante pour la cohésion entre les chromatides sœurs lors de la mitose et de la méiose. Elle fait partie du complexe des cohésines. L'expression de ce gène est régulée dans le cycle cellulaire et est plus importante en phase S.
<i>CDC13</i>	YDL220C	0.07x	La protéine lie le simple-brin télomérique de séquence TG ₁₋₃ et est essentielle pour la protection des télomères. Elle est également impliquée dans la régulation de la réplication des télomères via le recrutement de sous-complexe mais cette fonction n'est pas essentielle.

Tableau 4 : Liste des gènes d'intérêts dont l'expression est modifiée en absence de Cdc13p.

L'expression relative est indiquée selon l'expression sans Cdc13p versus l'expression lorsque Cdc13p est présent. Les informations sur les gènes ou les protéines sont fournies par Affimetrix (www.affimetrix.com).

Confirmation et validation des résultats par hybridation de type Northern.

Afin de confirmer les résultats obtenus par puce à ADN, nous avons vérifié l'expression de chaque gène d'intérêt par une autre méthode, soit l'hybridation de type Northern. Pour ces vérifications nous avons inclus une souche de type sauvage, deux clones des souches que nous avons utilisées pour l'analyse par puce à ADN ($\Delta 13$ -I T et $\Delta 13$ -I TC), ainsi que les 2 souches parentales, c'est-à-dire la souche de survivant de type I (*tlcΔ cdc13Δ* + *pcdc13-1*) et la souche $\Delta 13$ adaptée à partir du survivant (Figure 21, Matériel et méthodes). De cette façon, nous pouvons vérifier les résultats de la puce à ADN en comparant les mêmes souches et nous pouvons également vérifier si ces résultats s'appliquent aux souches parentales qui, elles, n'ont pas été utilisées pour l'hybridation des puces à ADN. Nous avons contrôlé la quantité d'ARN totale dans

chaque piste en mesurant l'ARNm d'ACT1 et en calculant un ratio entre le gène à vérifier et le gène *ACT1*. Nous avons également normalisé chaque ratio avec le ratio de la souche WT.

La première vérification à effectuer a été de s'assurer que l'ARNm de *CDC13* n'était pas exprimé dans les cellules $\Delta 13$. Comme on peut le voir à la Figure 26, il est impossible de détecter l'ARNm de Cdc13 dans les cellules $\Delta 13$ (Pistes 3, 5, 7 et 8) comme on peut le faire dans la souche WT (Piste 1), les souches survivantes parentales (Pistes 2 et 6) et pour les souches qui ont été complémentées (Pistes 4 et 9). Par contre, l'expression sur plasmide (pCDC13 ou pcdc13-1) semble plus élevée que dans une souche de type sauvage WT. En effet, si on observe le ratio des ARNm Cdc13/Act1, on remarque que l'ARNm de Cdc13 est plus exprimé d'environ 50% dans les souches contenant le plasmide que dans la souche WT.

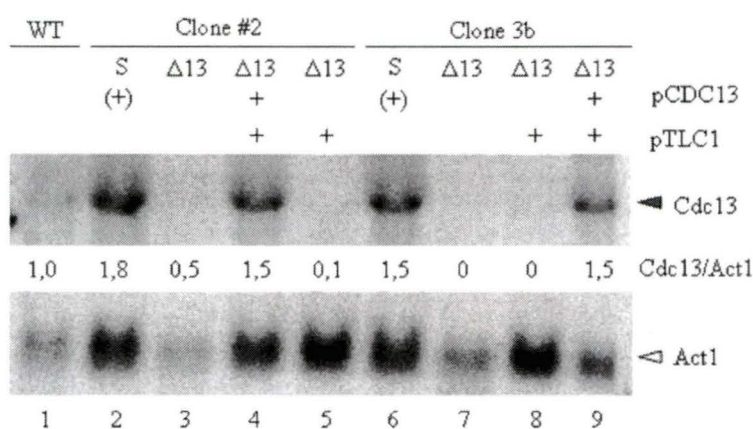


Figure 26: Vérification de l'expression de l'ARN de *CDC13*

À partir de deux clones indépendants (*tlcΔcdc13Δ* + pcdc13-1), des survivants de type I ont été générés (matériel et méthode, données non montrées). Ces clones (#2 et 3b) dont l'ARN a été extrait (pistes 2 et 6) contiennent le plasmide pcdc13-1(+). Chaque clone a été utilisé pour générer des cellules $\Delta 13$ (*tlcΔcdc13Δ*) (pistes 3 et 7) et ensuite ces souches ont été transformées avec les plasmides pTLC1 et/ou pCDC13 pour restaurer l'état normal des télomères (pistes 4, 5, 8 et 9). L'ARN total de ces souches, en plus d'une souche WT du même génotype, a été extrait et analysé par hybridation Northern. La membrane a été hybridée avec une sonde *CDC13* et avec une sonde *ACT1* pour servir de contrôle de chargement. Les ratios de l'expression de Cdc13 sur l'expression d'Act1 relatifs à l'échantillon WT sont indiqués. Cette expérience a été effectuée 2 fois avec les mêmes résultats et le troisième clone utilisé dans la puce à ADN a également été analysé.

Pour les autres gènes identifiés comme étant intéressants (Tableau 4), l'expression dans les cellules a également été vérifiée par hybridation Northern (Voir Matériel et méthode, section « Buvardage de type Northern »). Malheureusement, pour les gènes *RAD59*, *RPB9* et *MCD1*, le niveau d'expression de ces gènes n'a pas permis de détecter l'ARNm dans aucune des souches étudiées par cette méthode (résultats non montrés). Nous sommes toutefois parvenus à détecter les ARNm des gènes *PTP2*, *MMS2*, *DNL4* et *HUG1*, bien que les ARNm de *DNL4* et *HUG1* soient très faiblement exprimés en conditions normales de croissance.

Pour l'ARNm de *DNL4*, comme pour les autres ARNm vérifiés, les niveaux d'expression ont été égalisés selon l'expression du gène *ACT1* et normalisés par rapport à l'expression dans une souche de type sauvage. Donc l'expression de *DNL4* semble être plus faible dans les souches survivantes que dans la souche WT (Figure 27, pistes 1 et 6). La même chose est observée avec les souches $\Delta 13$ (Figure 27, pistes 3 et 7) et avec les souches $\Delta 13$ -I T et $\Delta 13$ -I TC (Figure 27, pistes 4, 5, 8 et 9). Maintenant, en comparant les souches survivantes (S) avec les $\Delta 13$ (Figure 27, pistes 2 vs 3 et 6 vs 7), et les souches $\Delta 13$ -I T avec les $\Delta 13$ -I TC (Figure 27, pistes 4 vs 5 et 9 vs 8) entre elles, on note qu'il n'y a pas une grande augmentation de l'expression dans les souches sans Cdc13p. Par contre, il semble y avoir une légère augmentation présente dans toutes les souches sans Cdc13p lorsqu'elles sont comparées avec les souches originales. En effet, comme il est possible d'observer à la Figure 27, peu importe le clone ou les souches utilisées, il y a constamment une augmentation du niveau d'ARNm dans les souches $\Delta 13$ (Figure 27, Pistes 3, 5, 7, 8). Les mêmes résultats ont été obtenus avec un autre clone et l'expérience a été effectuée 2 fois. Dans les souches survivantes de type I comparées aux souches $\Delta 13$, il y en moyenne une augmentation de 1,2x de l'expression de *DNL4* dans les $\Delta 13$ (ex : Pistes 3 et 2, 7

et 6). Lorsque les souches complémentées avec les plasmides sont utilisées, l'augmentation est de 1,4x en moyenne dans les souches sans pCDC13 (ex ; Pistes 5 et 4, 8 et 9). Par contre, dans toutes ces souches l'expression de *DNL4* est plus faible que dans le WT.

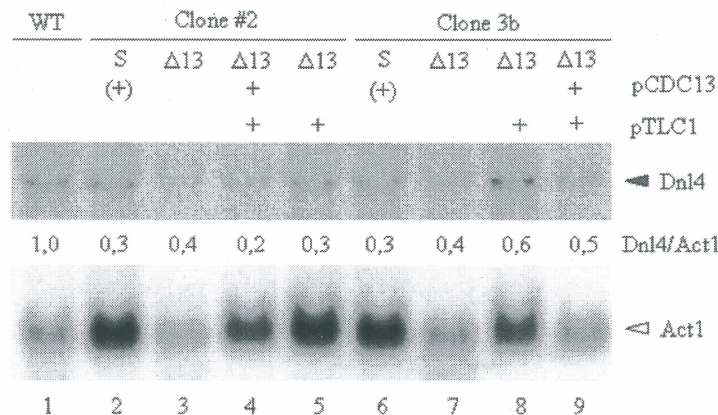


Figure 27: Analyse de l'expression de *DNL4*

L'ARN total a été hybridée avec des sondes *DNL4* et *ACT1* (Figure 26). L'expérience a été effectuée 2 fois.

Comme pour l'expression de *DNL4*, l'expression du gène *PTP2* est plus faible dans les souches étudiées que dans la souche WT (les ratios sont inférieurs à 1, Figure 28). Par contre, contrairement à l'expression du gène *DNL4*, la quantification de l'expression de *PTP2* ne permet pas d'observer de modification qui est constante dans un type de cellule (Figure 28). Il y a une très légère variation dans l'expression selon le clone et la souche utilisée, mais cette variation ne permet pas de dire que l'expression de ce gène est augmentée dans les cellules sans Cdc13p comparativement aux souches originales avec Cdc13p (Figure 28, pistes 3, 5, 7 et 8). Cette petite variation semble davantage due à l'expérimentation qu'au génotype des souches utilisées, étant donné que ce n'est pas un phénomène constant. Finalement, le gène *PTP2* ne semble pas surexprimé dans les cellules $\Delta 13$ alors que les résultats de l'hybridation sur puce à ADN nous indiquaient qu'il était très faiblement surexprimé (Tableau 4).

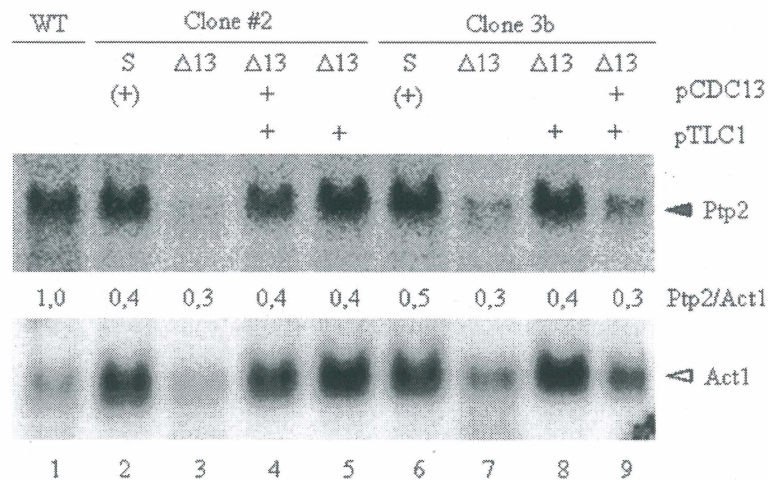


Figure 28 : Analyse de l'expression de *PTP2*

L'ARN total a été hybridée avec des sondes *PTP2* et *ACT1* (Figure 26).

Les résultats d'hybridation Northern avec le gène *MMS2* montre qu'il y a de la variation entre les expériences, notamment lorsque les niveaux d'expression des différentes souches sont comparés à la souche WT. En effet, à la Figure 29 A) les ratios *Mms2*/Act1 varient de 0.3 à 0.9 alors que dans une répétition de l'expérience à la Figure 29 B), les ratios varient de 1.0 à 1.4. Cependant, les résultats obtenus dans une même expérience ressemblent à ceux obtenus avec le gène *DNL4*, c'est-à-dire qu'il y a une très légère augmentation de l'expression dans les souches sans Cdc13p comparativement aux souches originales avec Cdc13p (Figure 29 A) Pistes 2 vs 3, 4 vs 5, 6 vs 7 et 9 vs 8 et Figure 29 B) Pistes 3 vs 4, vs 5 vs 6 et 8 vs 7). Ces résultats sont constants d'une souche à l'autre et d'une expérience à l'autre. Donc, encore une fois, en absence de Cdc13p, l'expression de ce gène est légèrement augmentée si on compare avec les souches originales. L'expérience d'hybridation de type Northern a été effectuée pour vérifier l'expression de *MMS2* dans les $\Delta 13$ (2 exemples Figure 29) et il y a certaines variations dans les niveaux d'expression entre les expériences, mais dans les cellules sans Cdc13p, autant pour les cellules utilisées pour l'hybridation des puces à ADN que les souches parentales, l'expression de *MMS2* est systématiquement

plus élevée. Par contre, à cause de la grande variabilité entre les expériences et entre les souches utilisées, la surexpression mesurée par hybridation est très faible et peu significative (Les écarts-types sont très grands, résultats non montrés). Alors, nous avons voulu vérifier que l'induction de l'expression de *MMS2* suite à une exposition au MMS, déjà répertoriée dans la littérature (Gasch et al., 2001; Ulrich, 2001), était observable en utilisant l'hybridation de type Northern. Une culture en phase exponentielle a été exposée à une concentration de 0.1% MMS pendant 4h (Figure 29 B Piste 1 et 2). Dans ces conditions, l'augmentation de l'expression de *MMS2* est de 1,5x relativement à la souche WT. Finalement, l'augmentation de l'expression de *MMS2* dans les cellules est faible et il reste à vérifier si biologiquement ce changement a un effet.

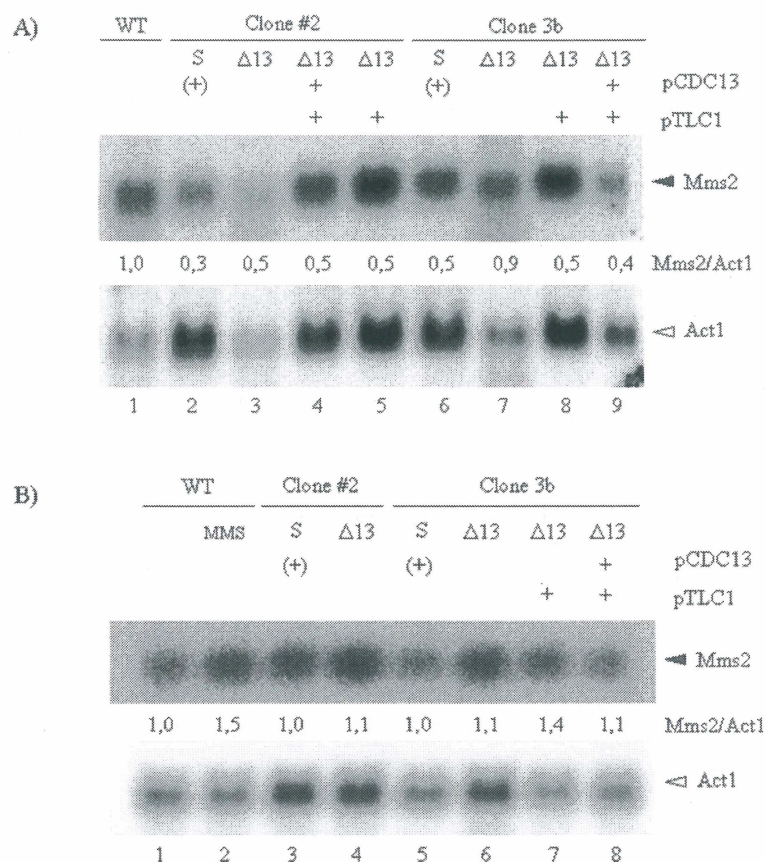


Figure 29 : Analyse de l'expression de *MMS2*

L'ARN total a été hybridée avec des sondes *MMS2* et *ACT1* (Figure 26). L'expérience d'hybridation a été effectuée plusieurs fois avec différentes souches et deux exemples sont présentés en A et B. A)

L'expérience a été effectuée comme à la Figure 26. B) L'induction de l'expression de MMS2 suite à l'exposition au MMS (0.1% de MMS pendant 4h) a été mesurée dans la piste 2 et comparée à la modification d'expression dans les cellules $\Delta 13$ dans les pistes 4, 6 et 7.

Le gène le plus intéressant qui est sorti de l'analyse par puce à ADN de l'expression dans les cellules $\Delta 13$ est le gène *HUG1* étant donné qu'il a été suggéré que ce gène pourrait être impliqué dans le mécanisme de relâchement des points de contrôles (Basrai et al., 1999). De plus, il est un des gènes dont l'expression est la plus grandement modifiée (Tableau 4). Par contre, l'expression de ce gène est difficile à détecter par hybridation Northern parce que ce gène est très faiblement exprimé en absence de dommages à l'ADN. Dans certaines conditions particulièrement optimales, il est possible de détecter l'expression de ce gène en absence de dommages. D'abord, en observant les résultats d'hybridation de type Northern à la Figure 30, il est possible de constater qu'il y a une augmentation de l'expression de *HUG1* dans les souches utilisées comparées à la souche de type sauvage (WT). L'augmentation est particulièrement forte dans les souches utilisées pour l'expérience de micropuce. En effet, dans les souches $\Delta 13$ -I TC comparées aux souches $\Delta 13$ -I T (Figure 22, Figure 30 pistes 4 et 5), l'expression du gène *HUG1* est clairement augmentée en absence de pCDC13. Cette augmentation, pour le clone 3b, est de 3,8x comparativement au niveau d'expression dans une souche WT et de 2,7x comparativement à la même souche contenant le plasmide pCDC13. Ces résultats, de même que les répétitions de l'expérience avec les autres clones (exemple : Figure 31 pistes 7-10), confirment les résultats de l'hybridation de la puce ADN où il était possible de détecter une augmentation de 2.97x dans les $\Delta 13$ -I T comparativement aux souches $\Delta 13$ -I TC (Tableau 4). Maintenant, le niveau d'expression des souches survivantes (S-I) est augmenté comparativement au niveau dans la souche WT (Figure 30 pistes 1 et 3, Figure 31 pistes 1, 3 et 5). En comparant l'expression de *HUG1* dans les survivants à

l'expression dans les $\Delta 13$, il est clair que contrairement aux souches utilisées pour l'hybridation de la micropuce, l'expression est diminuée dans les $\Delta 13$ (Figure 30 piste 2 vs 3, Figure 31 pistes 3 vs 4 et 5 vs 6) et elle est à peu près équivalente à celle dans la souche WT (Figure 30 pistes 1 vs 3, Figure 31 pistes 1 vs 4 et 6). Toutefois, étant donné que l'expression est très faible et à la limite de détection de la technique d'hybridation Northern, il est difficile de quantifier des signaux très faibles. Il est possible de voir les bandes dans les souches $\Delta 13$ -I T (Figure 30 pistes 4, Figure 31 pistes 7 et 9) alors que dans les autres souches la visualisation est plus difficile. Néanmoins, il est clair que *HUG1* est surexprimé dans les souches utilisées pour l'expérience de micropuce, mais ne semble pas surexprimé dans les autres souches sans Cdc13p.

Étant donné que *HUG1* est surexprimé en présence de dommage à l'ADN nous avons utilisé un échantillon traité avec un agent qui endommage l'ADN, le MMS, afin de confirmer que nous détectons bien l'ARNm du gène *HUG1*. Il est possible d'observer à la Figure 31 piste 2, que l'ARNm est bien augmenté lorsque les cellules sont mises en présence de MMS d'environ 12x, mais l'augmentation que nous observons est sans doute surévaluée étant donné une tache d'hybridation non-spécifique qui augmente légèrement le signal détecté dans les pistes 2 et 3 de la Figure 31. La prochaine étape est, comme avec les gènes *DNL4* et *MMS2*, de confirmer que les suppressions observées dans ces souches ont une signification biologique et surtout un impact sur la survie des cellules en absence du gène essentiel *CDC13*.

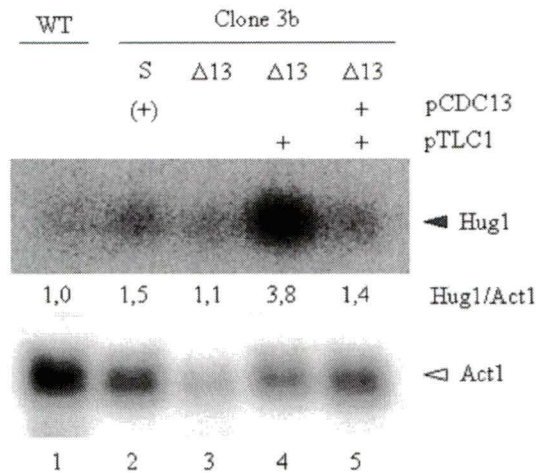


Figure 30 : Analyse de l'expression de *HUG1*

L'ARN total a été hybridée avec des sondes *HUG1* et *ACT1* (Figure 26).

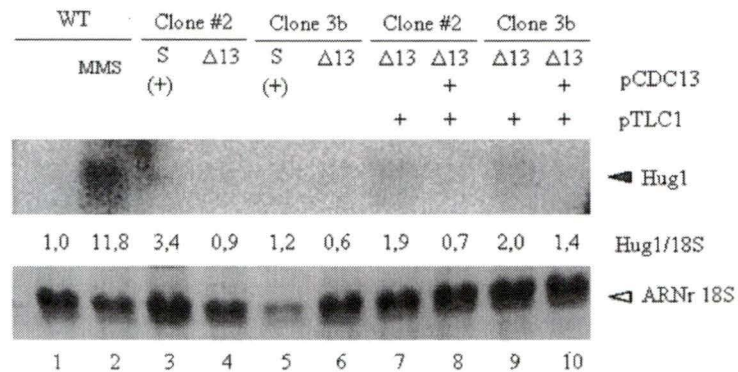


Figure 31 : Analyse de l'expression de *HUG1* dans les cellules $\Delta 13$ ou suite à des dommages à l'ADN

L'ARN total a été hybridée avec la sonde *HUG1* et l'ARN ribosomal 18S a été coloré au bleu de bromophénol. Les ratios de l'expression de Hug1 sur la quantité d'ARNr 18S relatif à l'échantillon WT sont indiqués. Voir la description de la Figure 26 pour les détails des souches utilisées et la description de la Figure 29 pour le traitement au MMS.

Analyse de l'effet de la présence de *DNL4*, *MMS2* et *HUG1* en plusieurs copies sur la fréquence et le taux d'adaptation à la perte de Cdc13p.

Les résultats obtenus par micropuce d'ADN ont été confirmés ou infirmés en utilisant la technique d'hybridation de type Northern pour quantifier le niveau des ARNm des gènes identifiés comme étant intéressants. Les gènes *DNL4* et *MMS2* semblent être faiblement surexprimés en absence de *CDC13*, alors que le gène *HUG1* est surexprimé dans les souches $\Delta 13$ utilisées pour l'hybridation de la puce à ADN.

Étant donné que les changements d'expression sont minimes et qu'ils pourraient n'avoir aucun impact sur la biologie cellulaire lors de l'adaptation des levures à la perte de Cdc13p, il est important de confirmer le rôle de ces légers changements de niveau d'expression. Les trois gènes ont donc été clonés sur un plasmide contenant une origine de répllication 2 μ afin d'avoir plusieurs copies de ces gènes dans une même cellule (Matériel et Méthodes, (Brachmann et al., 1998)). L'expression de ces gènes a ensuite été vérifiée dans les survivants indépendants de la télomérase. Pour le gène *MMS2* il a été possible de détecter une surpression de 2,5x dans les survivants de type I et de 11x dans les survivants de type II comparativement aux souches de survivants contenant des plasmides vides (Figure 32). Par contre, avec cette méthode de surexpression, il a été impossible de détecter une augmentation de l'expression des gènes *DNL4* et *HUG1* lorsque ceux-ci sont présents en plusieurs copies (environ 100 copies) (Clark-Walker et Miklos, 1974; Livingston, 1977; Sinclair et al., 1967). Il faut mentionner le gène *DNL4* n'est pas fortement exprimé et il est difficile à détecter son expression par hybridation Northern tandis que l'expression du gène *HUG1* est réprimée.

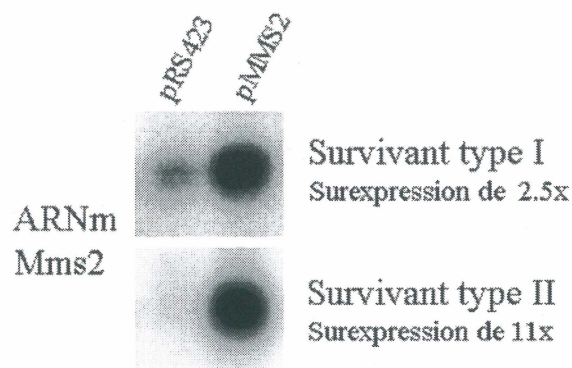


Figure 32 : Surexpression du gène *MMS2* dans des survivants sans *TLC1*

L'ARN total a été hybridée avec la sonde *MMS2* (Figure 26). Des souches de survivants de type I et II, ont été transformées avec un plasmide vide (pRS423) ou avec le plasmide contenant le gène *MMS2* (pMMS2) sous l'expression de son propre promoteur. L'expérience a été effectuée plusieurs fois avec plusieurs clones. L'expression de *MMS2* a été comparée à celle du gène *ACT1* afin de contrôler la

quantité d'ARN par piste. Les niveaux de surexpression ont été calculés en comparant les ratios d'expression de *Mms2/Act1* selon le plasmide présent dans la souche.

Ainsi, ces clones ont été utilisés pour vérifier si la surexpression ou la présence de plusieurs copies des gènes identifiés avaient un impact sur la capacité des cellules à s'adapter à la perte de fonction de Cdc13p. Les procédures décrites dans la section Matériel et méthodes ont été utilisées pour mesurer la fréquence d'adaptation et le taux d'adaptation. D'abord, les expériences ont été effectuées afin de déterminer la fréquence d'adaptation pour mesurer la chance qu'une cellule qui survit à l'exposition à une température semi-permissive (30°C) a de s'adapter à la perte de fonction de Cdc13p. Pour vérifier l'effet de la surexpression ou de la présence des gènes en multiple copie, les souches $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II ont été utilisées, auxquelles nous avons ajouté les plasmides avec les promoteurs endogènes et l'origine de répllication 2 μ . Seulement les résultats obtenus les survivants de type II seront présentés, parce que ceux obtenus avec les survivants de type I n'étaient pas concluant à cause du faible taux de survie des survivants de type I (données non montrées, Victor Karpov données non publiées). Après de multiples répétitions de l'expérience, il y a beaucoup de variabilité entre les résultats de celles-ci, même en utilisant un seul clone plusieurs fois. Finalement, après plusieurs répétitions en utilisant trois clones différents les résultats sont présentés à la Figure 33. Les fréquences d'adaptation sont calculées seulement à partir des cellules ayant survécu à l'exposition de 24h à une température semi-permissive. Les fréquences d'adaptation obtenues indiquent que les gènes *DNL4* et *HUG1* sur plasmide 2 μ n'ont pas d'impact positif sur l'adaptation. De façon similaire, la surexpression du gène *MMS2* n'a pas d'effet positif sur la capacité des cellules à s'adapter à la perte de Cdc13p.

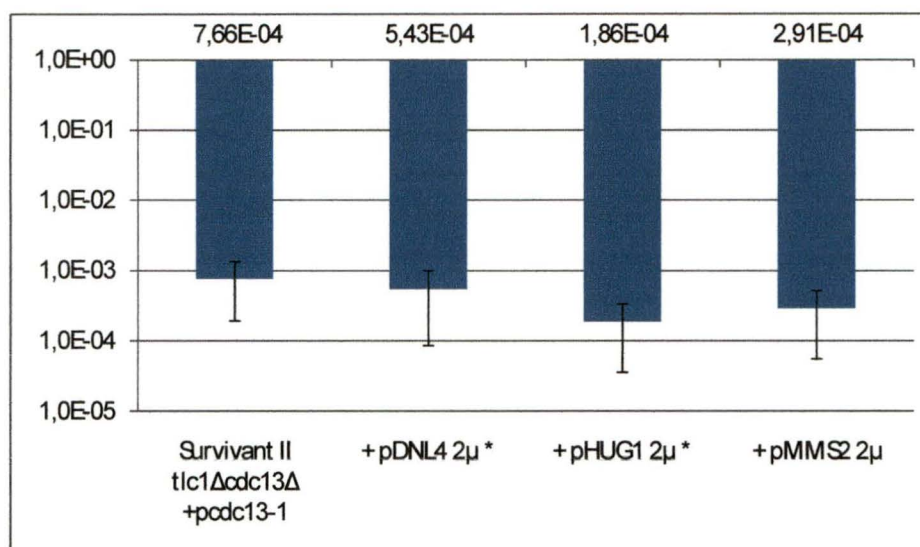


Figure 33 : Fréquence relative d'apparition de cellules capable de survivre en absence de Cdc13p

La fréquence relative a été déterminée en calculant le ratio entre les cellules qui s'adaptent à la perte de Cdc13p (elles poussent à 37°C) et les cellules qui survivent suite à l'exposition à une température semi-permissif pendant 24h (elles poussent à 23°C). Les fréquences portées sur le graphique sont des moyennes de plusieurs expériences (3) effectuées avec trois clones différents et l'écart-type a été calculé à partir de ces moyennes et est représenté par les barres d'erreurs. Dans tous les cas, la souche utilisée est la souche survivante de type II *tlc1Δcdc13Δ* + *pcdc13-1* dans laquelle les plasmides identifiés ont été introduits. Les expériences ont été effectuées sur milieu Yc-His afin de conserver la sélection pour les plasmides. Les valeurs sont indiquées en haut des colonnes correspondant à chaque souche. *La surexpression de ces gènes n'a pas pu être détectée, toutefois ces gènes sont présents en plusieurs copies.

Enfin, une autre méthode a été utilisée pour vérifier si les changements d'expression qui serait moins variable entre les expériences et qui tiendrait compte du taux de division cellulaire. La méthode d'analyse de fluctuation pour déterminer le taux d'événement par cellule par division (adaptation à la perte de Cdc13p/cellule/division) a été privilégiée. La conception des expériences est décrite dans la section Matériel et méthodes et le calcul pour déterminer le taux d'adaptation est effectué à partir de l'équation de Luria et Delbruck (Luria et Delbruck, 1943). Ces expériences ont été répétées plusieurs fois avec une grande quantité de cultures et les résultats sont très semblables d'une expérience à l'autre et les taux d'adaptation obtenus sont toujours les mêmes pour une même souche. Les expériences ont été réalisées à partir d'une souche survivante de type II avec l'allèle *cdc13-1*, transformée

avec différents plasmides 2 μ codants pour les gènes d'intérêts. Comme contrôle, une souche contenant un plasmide permettant de surexprimer le gène *PTC2* a été construite. Ce gène est impliqué dans l'adaptation à un cassure-double brin d'ADN et il a été rapporté que sa surexpression améliore la capacité de cellule à s'adapter (Guillemain et al., 2007; Leroy et al., 2003). Les résultats obtenus avec cette technique montrent que dans aucun cas la présence des gènes en plusieurs copies ou la surexpression des gènes identifiés précédemment n'a un effet majeur sur le taux d'adaptation à la perte de Cdc13p (Figure 34). Le taux d'adaptation étant très bas, environ $1,6 \times 10^{-6}$ par cellule par division, on s'attend à voir des différences majeures, de plus de 10x dans les taux mesurés, si nos conditions modifient la capacité des cellules à s'adapter. Toutefois, il y a une légère différence d'environ 3x entre la souche contrôle (survivant II *tlc1 Δ cdc13 Δ + pcdc13-1*) et la souche transformée avec pMMS2. Afin de confirmer si le gène MMS2 a un effet sur le taux d'adaptation, une souche avec l'ORF MMS2 remplacé par un gène marqueur a été construite (Voir Matériel et méthodes). Une souche *tlc1 Δ cdc13 Δ mms2 Δ + pcdc13-1* a donc été générée et a été poussé jusqu'à la sénescence et l'apparition de survivants (Matériel et méthode Figure 21). Une fois les survivants de type II obtenus, l'analyse de fluctuation a été effectuée pour déterminer le taux d'adaptation à la perte de Cdc13p pour une souche qui ne contient pas *MMS2*. Étonnamment, l'absence de Mms2p n'induit pas de défectuosité dans la capacité aux cellules de perdre Cdc13p. En effet, même en absence de Mms2p les cellules peuvent s'adapter lorsqu'elles sont exposées à une température où la protéine codée par l'allèle *cdc13-1* est partiellement fonctionnelle et parviennent dans une faible proportion à vivre sans *CDC13*. De plus, non seulement les cellules peuvent s'adapter sans *MMS2*, mais le taux d'adaptation n'est pas diminué, au contraire, il est augmenté de plus de 10x. Le taux d'adaptation

des cellules survivantes de type II sans *MMS2* est de $2,15 \times 10^{-5}$ adaptation/cellule/division (Figure 35). Donc il n'y a pas de corrélation directe entre la capacité des cellules à perdre Cdc13p et le niveau d'expression de *MMS2*.

Finalement, pour aucun des gènes que nous avons identifiés comme étant intéressants nous avons été en mesure de confirmer un rôle dans l'adaptation à la perte de Cdc13p.

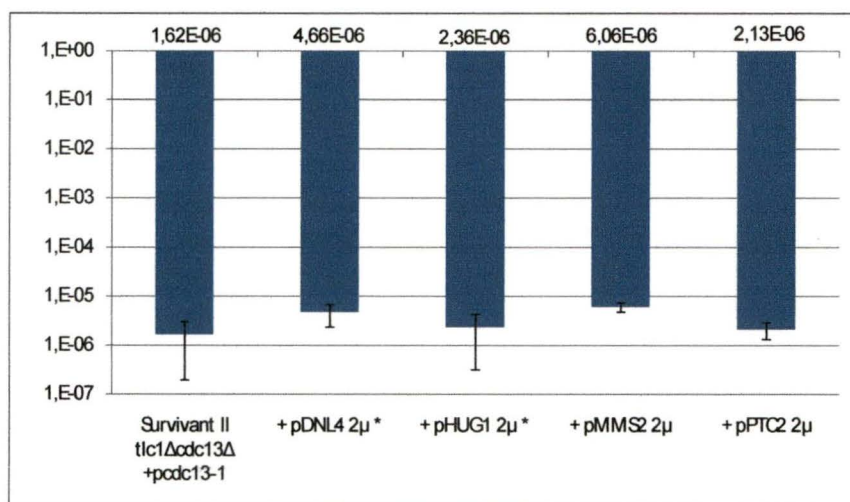


Figure 34 : Taux d'adaptation à la perte de Cdc13p selon les gènes présents en plusieurs copies.

Le taux d'adaptation a été calculé en utilisant la méthode décrite dans la section Matériel et méthodes. Le taux d'adaptation en événement par cellule par division cellulaire est indiqué en haut de chaque colonne. Les expériences ont été effectuées minimum 3 fois et chaque expérience contenait 20 cultures indépendantes. Les moyennes des taux d'adaptation sont portées sur le graphique et l'écart-type a été calculé à partir de ces moyennes et est représenté par les barres d'erreurs. Les mêmes souches ont été utilisées que pour l'expérience sur la fréquence d'adaptation Figure 33. Sauf pour la souche identifiée +pPTC2, le plasmide avec l'origine de répllication 2μ contenant le gène *PTC2* est décrit dans la section Matériel et méthodes.

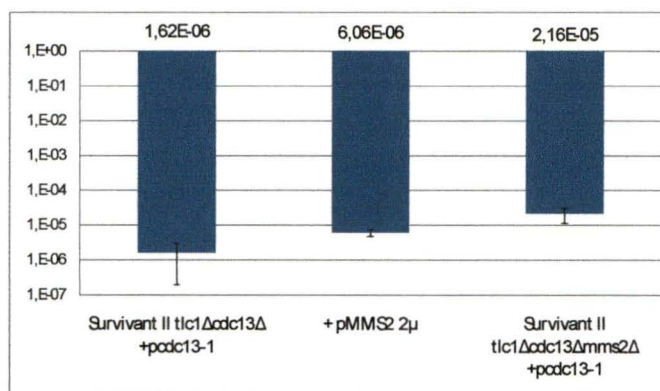


Figure 35 : Taux d'adaptation à la perte de Cdc13p en fonction de l'expression de MMS2

Voir la Figure 34 pour une description. Les souches sont les mêmes qu'à la Figure 34 sauf la souche survivante II *tlc1Δcdc13Δmms2Δ* + *pcdc13-1* qui est décrite dans la section Matériel et méthodes. Les expériences ont été effectuées minimum 3 fois et chaque expérience contenait 20 cultures indépendantes. Les moyennes des taux d'adaptation sont portées sur le graphique et l'écart-type a été calculé à partir de ces moyennes et est représenté par les barres d'erreurs.

Discussion et conclusions

Étude du simple-brin télomérique : Optimisation d'une technique

Nous avons déjà démontré qu'il est possible d'utiliser la technique d'extension d'amorce modifiée pour mesurer le simple-brin télomérique de la levure (Chapitre 1, section Résultats (Larrivee et al., 2004)). L'objectif de cette étude était d'améliorer cette technique pour la rendre plus reproductible et plus fiable. Nous avons amélioré les étapes d'appariement et d'extension d'amorce, de polyadénylation et de purifications des TRF.

D'abord, nous avons donc identifié les conditions optimales pour effectuer l'extension d'amorce mais malgré l'optimisation de ces conditions, on note la présence de bandes intermédiaires et de produits de déplacements (Chapitre 1, Résultats, Figure 10 et 11). Les bandes intermédiaires apparaissent lorsque la polymérase ne parvient pas à étendre l'amorce jusqu'à la jonction double-brin, ces bandes représentent une

faible proportion des produits d'élongations (<5%, résultats non montrés). Par contre, ces résultats ont été obtenus en utilisant un substrat d'oligonucléotide *in vitro*, dans des conditions idéales comparativement à l'utilisation de TRF purifiés qui pourraient contenir des contaminants. Donc l'incapacité de la T4 ADN polymérase d'étendre l'amorce jusqu'à la jonction double-brin sur des TRF purifiés pourrait expliquer pourquoi nous observons une échelle de polymérisation (Chapitre 1, Résultats, Figure 9), plutôt que quelques bandes à environs +15 nucléotides. Les produits de déplacements, quant à eux, pourraient nous amener à surestimer la taille du simple-brin télomérique, mais dans les conditions établies, nous sommes parvenus à limiter cette activité (<5%, résultats non montrés).

L'optimisation de la température d'appariement et d'élongation, en parallèle avec l'optimisation de l'amorce, était une étape importante. En effet, ces modifications ont un grand impact sur l'efficacité de la réaction d'extension (Figure 11 et Tableau 3A). En modifiant la longueur de l'amorce et ainsi sa température de fusion (T_m), et en modifiant la température de réaction (Rychlik et al., 1990), nous avons pu obtenir les conditions idéales pour notre réaction. Finalement, la meilleure combinaison est d'avoir une température d'hybridation et d'extension relativement élevée, combinée avec plusieurs nucléotides d'alignements. Cette combinaison permet d'augmenter la spécificité de l'amorce pour qu'elle se positionne exactement à la jonction entre le simple-brin télomérique et la queue PolyA qui a été ajoutée et ainsi améliorer l'efficacité d'extension.

Nous avons également remarqué que l'efficacité de l'extension est grandement diminuée lorsque le substrat d'oligonucléotide est polyadénylé avec la TdT plutôt que prépolyadénylé (Chapitre 1, Résultats, Tableau 3). Dans le même contexte, les amorces PolyT sont partiellement dégradées ce qui pourrait expliquer la diminution de

l'efficacité. La dégradation des amorces est probablement le résultat de l'activité exonucléase 3'→5' de l'ADN polymérase T4 (Muzyczka et al., 1972). En effet, la queue PolyA synthétisée par la TdT est d'une longueur variable et elle est plus longue que celle synthétisée à même l'oligonucléotide substrat DUP16PolyA. L'amorce PolyT peut donc s'apparier à différents endroits sur cette région polyA mais cet appariement ne sera pas parfait, étant donné les nucléotides d'alignement présent en 3' des amorces PolyT. Les nucléotides mésappariés ne pourront pas servir à l'élongation puisqu'il n'y a pas de dTTP dans la réaction. Par contre, il est possible que l'extrémité non appariée des amorces polyT soit dégradée par l'activité exonucléase de l'ADN polymérase et ainsi la quantité d'amorce disponible pour l'élongation sera diminuée.

Nous avons tenté d'optimiser cette étape en utilisant des substrats d'oligonucléotides radiomarqués ou des TRF purifiés et en même temps, en utilisant une TdT recombinante et différents tampons de réaction. L'objectif était donc d'obtenir une courte queue polyA (environ 20 nucléotides) et de maximiser les molécules substrats polyadénylés. Afin d'obtenir ces résultats, une grande quantité de TdT a été utilisée pour maximiser la proportion des molécules de substrat polyadénylé et le temps de réaction a été limité à 1 minute afin d'obtenir de courte queue polyA. Nous avons également utilisé un tampon mieux approprié pour la TdT que le tampon One-Phor-All fourni par GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada), un tampon cacodylate contenant du chlorure de cobalt (Anderson et al., 1999; Chang et Bolum, 1986). Finalement, dans les conditions optimales, un maximum de 70% des oligonucléotides substrats sont polyadénylés et ils possèdent une queue polyA d'une longueur estimée à 20-40 nucléotides (Chapitre 1, Résultats, Figure 14 et résultats non montrés). De plus, nous avons montré que dans ces conditions de réaction, la TdT n'était pas complètement spécifique aux extrémités 3' saillantes. Il est également

important de noter que l'utilisation de la TdT recombinante corrélait avec la présence d'une extension non-spécifique dans les gels (Chapitre 1, Résultats, Figure 15 et 16). Il est difficile d'expliquer cette extension non-spécifique étant donné que l'essai est justement construit de façon à rendre impossible l'extension non-spécifique. D'abord, à cause des nucléotides d'alignement qui positionnent l'amorce correctement, et surtout parce que la réaction d'élongation ne contient que des dCTP et des dATP, ce qui empêche la polymérisation sur un substrat non-télomérique. Cependant, nous observons un signal d'extension non-spécifique qui dépend de la présence de la TdT recombinante et qui semble se produire même lorsque les échantillons substrats sont traités avec des enzymes qui dégradent le simple-brin (Chapitre 1, Résultats, Figure 15 et 16). Nous avons émis l'hypothèse que des fragments d'acides nucléiques pourraient contaminer la préparation de la TdT durant sa purification. Catherine Desrosiers a donc introduit une étape supplémentaire afin d'éliminer les acides nucléiques de la préparation de protéine (Boule et al., 1998; Boule et al., 2000). Malgré cette étape supplémentaire de purification, il a été impossible d'éliminer l'extension d'origine inconnue qui semble survenir lors du traitement à la TdT.

Nous avons tenté d'utiliser une autre méthode pour enrichir les TRF, de façon à avoir une plus grande quantité de TRF purifiés et une purification exempte de contaminant. Donc, la chromatographie d'exclusion a été la méthode choisie pour isoler les fragments de restriction terminaux des autres fragments de restrictions produits de la digestion de l'ADN génomique. Donc, la résine, la Sephacryl S-500 (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) qui selon le manufacturier possède une limite d'exclusion de 1078pb pour les fragments d'ADN a été utilisée. La faisabilité de la technique a été évaluée en mesurant la séparation d'un marqueur de taille de fragment d'ADN. Étant donné qu'il était seulement possible d'isoler les fragments

d'ADN plus petit que 500pb avec la quantité de résine et la colonne dont nous disposions (Chapitre 1, Résultats, Figure 18), nous voulions trouver une façon de savoir si cette méthode permettrait d'améliorer la purification des TRF avant d'investir temps et argent pour nous procurer le matériel nécessaire à la purification de TRF génomique. Donc, nous avons utilisé les TRF du plasmide linéaire YLpFAT10 (Wellinger et al., 1993b) pour tenter d'enrichir en TRF plasmidiques une préparation d'ADN total qui contient l'ADN génomique et plasmidique. En séparant les fragments d'ADN selon leurs tailles, il a été possible d'obtenir des fractions qui contenaient la majorité des TRF plasmidiques et une minorité des autres fragments de restriction. Nous avons évalué la séparation des fragments d'ADN en visualisant l'ADN contenant des séquences télomériques. Évidemment, la majorité des fragments de restriction ne contiennent pas de séquences de télomère et ne seront pas détectés par la sonde télomérique utilisée, donc notre caractérisation de la purification tient compte seulement des fragments télomériques. Donc nous sous-estimons la quantité d'ADN génomique contaminant dans les fractions contenant les TRF plasmidique, qui n'est pas visible à la Figure 18. Par contre, il est possible d'estimer que la séparation des fragments d'ADN est la même s'ils contiennent des séquences télomériques ou non, alors étant donné que la purification par chromatographie d'exclusion a permis d'exclure la majorité (90%) des fragments télomériques de 7 ou 4,5kb, il en va de même pour les autres fragments de restriction de la même taille. Finalement, la purification de TRF plasmidiques a été possible par la méthode de filtration sur gel qui a permis de séparer les fragments plus petits que 500pb. Les fractions contenant les TRF plasmidiques ont pu être regroupées et précipitées, tandis que la quantité de TRF a été mesurée de façon spécifique par hybridation Southern.

Pour être en mesure de purifier des TRF génomiques de 1-1,3kb par cette méthode il faudrait disposer d'une colonne beaucoup plus grande (au lieu de la colonne de 30cm) et d'une quantité de résine plus importante. Dans ces conditions, il pourrait être possible de purifier les TRF génomiques de levure par chromatographie d'exclusion diffusion.

Nous avons utilisé des TRF plasmidiques purifiés comme substrats pour mesurer le simple-brin télomérique de différentes souches avec la méthode d'extension d'amorces modifiée. Les conditions optimisées que nous avons déterminées avec des oligonucléotides substrats ont été utilisées et de même qu'une quantité identique de TRF plasmidiques purifiés que d'oligonucléotides. Dans cette expérience il est difficile d'observer une différence entre l'extension produite à partir de simple-brin de souche WT et d'une souche *tel1Δ* (Chapitre 1, Résultats, Figure 19). Pour les deux souches, on peut détecter une extension qui correspond à un simple-brin d'environ 15 nucléotides et ce peu importe l'amorce utilisée. Ces résultats sont différents de ceux précédemment obtenus et surprenants étant donné qu'il serait plus probable que les mutants *tel1Δ* et *mre11Δ* aient un simple-brin similaire. En effet, ces deux gènes sont dans la même voie génétique (Goudsouzian et al., 2006; Ritchie et Petes, 2000; Usui et al., 2001) pour la maintenance des télomères. Maintenant, en partie grâce à la technique d'extension d'amorce développée par Catherine Lebel, il est connu que les mutants du complexe MRX ont un simple-brin télomérique altéré (Chai et al., 2006b; Larrivee et al., 2004). Toutefois, on peut imaginer qu'étant donné que le simple-brin télomérique peut être formé par l'action de la télomérase ou la dégradation du brin C-riche, la protéine Tel1p pourrait ne pas être impliquée dans la création du simple-brin, contrairement au complexe MRX. Les résultats obtenus avec les TRF plasmidiques (Chapitre 1, Résultats, Figure 19) présentent plusieurs

problèmes majeurs et les résultats avec les souches WT et *tellΔ* ne sont pas concluant. D'abord, le signal d'extension est simplement diminué suite à un traitement à l'Exonucléase I plutôt qu'abolie complètement. Ceci signifie que soit l'exonucléase ne fonctionne pas complètement ou qu'il y a toujours la présence d'un signal non spécifique malgré la nouvelle purification de TRF et l'utilisation de nouvelles solutions de réactifs. Le problème majeur de cette expérience est toutefois mis en évidence par l'ajout des autres fractions de purification qui ne doivent contenir qu'une infime quantité de TRF. En effet, les autres fractions de purification ne contiennent qu'au plus 3% des TRF plasmidiques (résultats non montrés) et la proportion de TRF génomiques présents dans cette préparation est minime, particulièrement parce que la quantité d'ADN total utilisé est la même. Bref, dans les autres fractions il y a une moins grande proportion de TRF que dans un extrait d'ADN total (~0.3%). Donc, les réactions d'extension pour ces fractions ont été effectuées en absence virtuelle de substrat, ce qui montre que l'extension est bel et bien le résultat d'une extension non spécifique, présente lorsque les échantillons sont traités avec la TdT.

Finalement, la technique d'extension d'amorce modifiée permettant de mesurer le simple-brin de *S. cerevisiae* est une technique difficile qui malgré l'optimisation des conditions est toujours difficile à réaliser. Nous avons décortiqué et optimisé les étapes d'appariement et d'extension d'amorce, de polyadénylation et de purification des TRF, avec comme objectif de rendre la technique plus fiable et plus robuste. Somme toute, il resterait du travail à effectuer pour rendre cette technique plus utile, mais dans l'état actuel il est possible de l'utiliser pour analyser le phénotype du simple-brin sur un mutant particulier. L'utilisation à grande échelle de cette technique se révélerait difficile et la majorité des problèmes rencontrés semble inhérent à la technique et il serait difficile de les améliorer de façon significative.

Étude des modifications d'expression génique suite à la perte du gène essentiel *CDC13*.

Lors de l'élaboration de cette expérience, nous avons différents objectifs, dont celui d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée sans Cdc13p et de trouver des gènes importants pour cette adaptation. Évidemment, nous nous attendions à retrouver certains groupes de gènes bien caractérisés. D'abord, pour vivre en absence du principal facteur dans la protection des télomères, la cellule doit être en mesure de contrecarrer quelques problèmes majeurs. Il est bien caractérisé qu'en absence d'une protéine Cdc13p fonctionnelle, comme dans le cas de l'allèle *cdc13-1*, il y a une accumulation du simple-brin aux télomères qui est reconnu par la machinerie des points de contrôles comme un dommage à l'ADN (Garvik et al., 1995; Nugent et al., 1996). Suite à la détection de cette dégradation d'un brin des télomères, il y a activation du point de contrôle en réponse aux dommages à l'ADN et arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Garvik et al., 1995; Jia et al., 2004). Donc théoriquement, il y aurait plusieurs voies qu'une cellule pourrait utiliser pour être capable de vivre en absence de Cdc13p. Elle pourrait trouver une façon de diminuer ou d'éliminer les dommages causés aux télomères soit en utilisant une méthode alternative pour protéger ses télomères, soit en diminuant l'action des protéines qui dégradent les télomères. Dans ce cas, on pourrait s'attendre à une diminution de l'expression des nucléases impliquées dans la dégradation des télomères (Bertuch et Lundblad, 2004; Tsolou et Lydall, 2007). Alternativement, la cellule pourrait utiliser des moyens pour vivre en présence de dommage, probablement en utilisant la recombinaison pour maintenir ses télomères (comme le font déjà les cellules survivantes sans télomérase) (Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999) et en inactivant la réponse des points de contrôle de dommage à l'ADN pour reprendre le cycle cellulaire (Lottersberger et al.,

2003; Paulovich et al., 1997; Weinert, 1998). Dans ce cas, on pourrait s'attendre à voir une modification de l'expression des gènes impliqués dans la recombinaison, dans l'activation des points de contrôles et l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que dans les gènes qui sont normalement induits en présence de dommages à l'ADN (Chang et al., 2002; Gasch et al., 2001; Jelinsky et Samson, 1999). De plus, comme il a été décrit dans l'introduction, l'adaptation à la perte de Cdc13p pourrait très bien s'apparenter au phénomène d'adaptation à une cassure double-brin irréparable de l'ADN (Sandell et Zakian, 1993). Si c'était le cas, on pourrait voir des modifications de l'expression des gènes impliqués dans ce type d'adaptation. Évidemment, dans ce projet nous tenons seulement compte de la possibilité que ces processus soient régulés par les niveaux d'expressions, sans preuve que les événements qui permettent à une cellule de s'adapter à la perte de Cdc13p sont causés par une modification d'expression quelconque. Il pourrait exister une multitude d'autres façons pour la cellule de modifier ces processus afin de s'adapter à la perte de Cdc13p dont les modifications post-traductionnelles.

Les souches utilisées pour l'expérience d'hybridation d'une puce d'expression ont été décrites dans les sections Matériel et méthodes et Résultats. Nous avons choisi d'utiliser une souche $\Delta 13$ -I complémentée avec *TLC1* et avec *CDC13*. Dans les expériences de micropuce, peu importe les conditions utilisées, il y a généralement une multitude de gènes dont l'expression est grandement modifiée. Il faut alors faire le tri entre les gènes qui sont réellement importants et les gènes dont l'expression est modifiée de façon indirecte. Normalement, la grande quantité de gènes dont l'expression est modifiée dans une expérience de micropuce d'expression rend l'analyse et l'interprétation des résultats ardues. C'est pour ces raisons que nous avons limité au maximum les différences entre les souches à étudier. Donc nous avons

utilisé une souche adaptée $\Delta 13$ -I (3 clones différents) dans laquelle nous avons introduit *TLC1* et *CDC13* ou un plasmide vide (Chapitre 2, Résultats, Figure 22). De cette façon, nous comparons la même souche avec ou sans Cdc13p. C'est pour cette raison que *TLC1* a été réintroduit, pour éviter que les modifications d'expression détectées soient le résultat du mode de maintien des télomères, plutôt que de l'absence de Cdc13p. En effet, une étude a identifié 650 ORFs dont l'expression était modifiée lors de la délétion de la télomérase et l'apparition des survivants (Nautiyal et al., 2002). Nous voulions éviter de comparer directement des souches survivantes de type I (*tlc1 Δ cdc13 Δ + pcdc13-1*) avec des souches $\Delta 13$ -I (*tlc1 Δ cdc13 Δ*) pour limiter le bruit de fond généré par le mode survivant et ces 650 gènes. De plus, la présence de la télomérase active dans les cellules $\Delta 13$ n'affecte pas leur phénotype télomérique ou leur sensibilité aux agents qui endommagent l'ADN (Larrivee et Wellinger, 2006). L'addition de la télomérase dans les survivants permet de rétablir des télomères de type sauvage au fil des générations tandis que dans les $\Delta 13$, elle n'a aucun effet tant que la protéine Cdc13p est absente. Donc, la seule différence entre les souches que nous avons comparées est la présence ou non de *CDC13*, alors les souches $\Delta 13$ doivent effectuer des modifications pour vivre sans Cdc13p. Nous avons donc choisi ces souches pour limiter au maximum les modifications qui ne sont pas dues à l'absence de *CDC13*. Finalement, nous avons choisi d'utiliser des souches construites à partir de survivantes de type I parce que le phénotype de sensibilité aux agents endommageant l'ADN est plus marqué.

Les résultats de l'hybridation de la puce à ADN pour l'analyse de l'expression globale dans les souches avec et sans Cdc13p nous ont grandement surpris. Contrairement à ce qui est généralement observé dans des expériences similaires, il y a très peu de gènes dont l'expression est modifiée. Globalement, il n'y a pratiquement

aucun effet de l'absence du gène *CDC13* sur les niveaux d'expressions dans le contexte où l'étude a été effectuée. De plus, parmi les quelques gènes dont l'expression est modifiée, cette modification est minime et rares sont les gènes dont l'expression est changée de plus de 2 fois dans les cellules sans Cdc13p. Étrangement, pratiquement aucun gène dont l'expression est modifiée de façon significative dans les $\Delta 13$ -I T (Chapitre 2, Résultats, Figure 22) n'est impliqué de façon directe ou indirecte dans les mécanismes de recombinaison, des points de contrôle, de réponse aux dommages à l'ADN, de l'adaptation à une cassure double-brin ou codant pour une protéine ayant une activité nucléase. Cette absence d'effet de la délétion de *CDC13* sur les niveaux d'expression peut s'expliquer par le fait que les processus cellulaires qui permettent aux cellules de survivre en absence de la principale protéine du capuchon télomérique sont contrôlés par d'autres mécanismes que la régulation de l'expression. Ce résultat peut également être expliqué par les souches utilisées dans l'expérience : nous avons utilisé des conditions afin de limiter les modifications d'expression non spécifique, mais de la même façon, des renseignements importants ont pu être perdus. En effet, en utilisant la même souche de base qui avait été adaptée à la perte de Cdc13p nous comparons entre elles deux souches qui se sont adaptées et que nous avons ensuite complémentées avec *CDC13*. Bien que cette complémentation restaure un phénotype normal, autant au niveau des télomères que de la sensibilité aux dommages à l'ADN, les modifications nécessaires à l'adaptation à la perte de Cdc13p sont peut-être toujours présentes dans la souche qui a été complémentée avec p*CDC13*. Donc, il est possible que les deux souches comparées contiennent les mêmes modifications qui sont nécessaires à l'apparition de souches $\Delta 13$ et il serait donc impossible de les détecter en comparant ces deux souches.

Néanmoins, nous avons identifié quelques gènes intéressants (Chapitre 2, Résultats, Tableau 4) qui pourraient avoir un lien avec le phénomène qui nous intéresse. Ces résultats d'expression ont été confirmés par une autre technique, l'hybridation de type Northern. Plusieurs gènes étant très faiblement exprimés dans les deux conditions, il a été difficile de confirmer plusieurs résultats.

Nous avons pu confirmer que les gènes *DNL4* et *MMS2* étaient très faiblement surexprimés dans les cellules $\Delta 13$, autant que dans les souches utilisées pour la puce à ADN que les souches parentales. Par contre, pour le gène *PTP2* il a été impossible d'observer une différence constante entre les $\Delta 13$ et les souches avec *Cdc13p*. Pour le gène *HUG1* nous avons détecté par Northern une bonne différence d'expression (plus de 2x) entre les souches $\Delta 13$ -I T $\Delta 13$ -I TC, c'est-à-dire les souches utilisées pour l'hybridation de la puce à ADN. Par contre, lorsque les souches $\Delta 13$ sont comparées aux souches survivantes de type II, il n'y a pas de surexpression de *HUG1* dans les $\Delta 13$. Cette différence est surprenante et elle pourrait être due à la présence d'une télomérase active ou de la croissance en milieu riche, parce que les souches survivantes type II et $\Delta 13$ ont été poussées dans un milieu riche (YEPD) alors que celles contenant les plasmides ont été poussées sur milieu synthétique. Nous avons également mesuré l'induction de l'expression de *HUG1* en réponse aux dommages à l'ADN. L'augmentation que nous avons observée est inférieure à celle observée dans la littérature, qui était une augmentation de 20 à 75 fois par rapport au type sauvage (Basrai et al., 1999). Toutefois, le traitement réservé aux cellules pourrait avoir généré moins de dommages à l'ADN et ainsi limité l'activation de l'expression de *HUG1*. Néanmoins, les résultats de la puce à ADN relativement à l'expression de *HUG1* ont été confirmés. Suite à ces expériences, nous devons déterminer si les différences

d'expression de ces gènes avaient un impact sur la capacité de s'adapter à la perte de Cdc13.

Il était surprenant de voir le gène *DNL4* être identifié suite à notre analyse des résultats de l'hybridation de la puce ADN. Ce gène est essentiel pour le mécanisme de formation d'une jonction de bouts non-homologue (Non-homologous end-joining ; NHEJ) (Wilson et al., 1997) et ce NHEJ créerait des fusions télomère-télomère qui sont des structures dommageables pour la cellule (Chan et Blackburn, 2003). Donc, dans le contexte où les télomères sont déprotégés suite à l'inactivation de Cdc13p et que cette déprotection les rend plus accessibles à des événements de fusions télomériques, on pourrait s'attendre à une inactivation du NHEJ. Or, l'expression de *DNL4* semble augmenter dans les $\Delta 13$, ce qui est contraire à ce qui est attendu.

Ensuite, il est connu que le gène *MMS2* est impliqué dans la réparation post-réplication (Broomfield et al., 1998) et qu'il est induit en présence de dommages à l'ADN (Gasch et al., 2001; Ulrich, 2001). Ce gène était intéressant parce que la réparation post-réplication pourrait être importante pour réparer les dommages qui pourraient être créés suite à la réplication des télomères des cellules $\Delta 13$ ou à gérer les cercles extra chromosomiques (Larrivee et Wellinger, 2006). C'est pour ces raisons hypothétiques, que nous avons décidé de pousser l'investigation sur le rôle de l'expression de *MMS2* sur l'adaptation des $\Delta 13$.

Donc, il était intéressant de vérifier l'effet d'une modification d'expression de ces gènes à la survie en absence de Cdc13p. Les gènes *DNL4* et *MMS2* ont été clonés avec leurs promoteurs sur un plasmide contenant une origine de réplication 2 μ . L'idée était d'obtenir le gène en plusieurs copies dans les cellules tout en conservant le mode de régulation de l'expression endogène. Toutefois, il nous a été impossible de détecter une surexpression pour le gène *DNL4* cloné sur plasmide 2 μ . Nous avons quand

même vérifié si la présence de plusieurs copies par cellules de ce gène allait avoir un impact sur l'adaptation. On peut imaginer que si la cellule doit surexprimer ces gènes pour s'adapter à une perte de Cdc13p, la présence de plusieurs copies de ces gènes facilitera leur surexpression. Évidemment, la fréquence d'adaptation et le taux d'adaptation ont été mesurés dans ce contexte pour vérifier cette hypothèse. Les expériences de détermination de la fréquence d'apparition de cellules capables de survivre en absence de Cdc13p ainsi que d'analyse de fluctuation nous ont permis de constater que ni la présence de *DLN4* en multiples copies, ni la surexpression de *MMS2* n'ont un impact majeur sur l'adaptation à une absence de Cdc13p. On pourrait toutefois conclure à un effet du niveau d'expression de *MMS2*, étant donné que lorsqu'il est surexprimé ou en son absence, les cellules s'adaptent plus facilement qu'à des niveaux d'expression WT. Pourtant, aucun de ces résultats n'est frappant et l'interprétation de ce type de résultat est difficile.

Le gène *PTC2* a été inclus dans nos analyses de surexpression dans le but de confirmer que certains facteurs importants pour l'adaptation à une cassure double-brin sont également importants pour l'adaptation à la déprotection des télomères. Victor Karpov dans le laboratoire avait déjà confirmé que les survivants sans *PTC2* avaient beaucoup plus de difficultés à s'adapter à la perte de Cdc13p (le taux d'adaptation est diminué de plus de 3000x sans *PTC2*, Victor Karpov, données non publiées). Étant donné que le niveau d'expression de *PTC2* peut permettre à certaines souches de s'adapter à une cassure double-brin (voir introduction (Leroy et al., 2003)), ce gène a été inclus afin de voir si une augmentation de son expression pourrait nous permettre de voir une différence dans le taux d'adaptation. Nous avons réussi à observer une surexpression de plus de 2x avec un plasmide 2 μ pour le gène *PTC2*. Étonnamment, il n'y avait pas d'augmentation du taux d'adaptation lors de la surexpression de *PTC2*,

même si nous savons que ce gène est impliqué dans la survie des cellules sans Cdc13p. Peut-être que le niveau d'expression atteint n'était pas suffisant ou que contrairement aux souches *yku80* et *cdc5-ad*, une surexpression de *PTC2* n'a pas d'impact sur la génération de souches indépendante de la télomérase et du capuchon télomérique (Leroy et al., 2003).

Le gène *HUG1* était sans doute le plus intéressant parce que basé sur des expériences génétiques, il a été suggéré qu'il serait impliqué dans le relâchement des points de contrôle (Basrai et al., 1999). Ce phénomène serait essentiel à l'adaptation des cellules à la déprotection permanente de leurs télomères, de la même façon qu'il est important pour l'adaptation à une cassure double-brin. Par contre, suite aux expériences de détermination de la fréquence d'adaptation et du taux d'adaptation à la perte de Cdc13p, la présence du gène *HUG1* en plusieurs copies n'a pas d'effet sur la capacité des cellules survivantes type II à s'adapter à la perte du gène *CDC13*.

Malgré, ces résultats, le gène *HUG1* pourrait toujours être impliqué dans la génération de cellules indépendantes de Cdc13p. Pour confirmer ce lien, il faudrait induire une surexpression de ce gène, notamment via un promoteur fort inductible et mesurer l'effet par analyse de fluctuation. Une autre façon de mesurer l'implication de *HUG1* serait évidemment d'utiliser une souche *hug1Δ* et de vérifier si cette souche peut perdre Cdc13 et si oui, si ce taux est diminué. Nous avons tenté d'effectuer ces deux expériences, mais pour des raisons techniques, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir des résultats concluants. D'abord, le gène *HUG1* a été cloné sous promoteur Gal1 mais un faible taux de viabilité des cellules survivantes de type II +*pcdc13-1* + *pGal1p-HUG1* nous empêche d'obtenir des résultats (résultats non montrés). De la même façon, il a été impossible d'effectuer la délétion du gène *HUG1* malgré plusieurs tentatives. Pourtant, selon la littérature, la surexpression de *HUG1* ne cause

pas de problèmes de viabilité et le mutant de délétion est viable (Basrai et al., 1999). Étant donné que l'expression du gène *HUG1* est réprimée en condition normale, probablement via le répresseur *CRT1*, nous pourrions également vérifier la liaison de ce répresseur, et des protéines Tup1p et Cyc8p qu'il recrute, au promoteur de *HUG1* dans les souches survivantes et dans les souches $\Delta 13$. De cette façon, nous pourrions confirmer le changement d'expression de *HUG1* dans les cellules $\Delta 13$.

Finalement, afin d'obtenir des résultats plus significatifs, ou de confirmer que l'adaptation des cellules à une absence de Cdc13p ne passe pas par une modification de l'expression de gène, mais plutôt par un autre processus de contrôle, nous devons recommencer l'expérience d'hybridation des ARNm sur micropuce. D'autres souches doivent être utilisées, des souches qui n'ont jamais été adaptées et comparer des survivants indépendants de la télomérase avec des cellules $\Delta 13$ indépendants de la télomérase et de la protéine Cdc13p. Peut-être que de cette façon, nous allons pouvoir recueillir des données plus pertinentes.

Remerciements

Je tiens à remercier Dr.Raymund Wellinger de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir guidé dans mon cheminement et ainsi d'avoir parfait mon éducation. J'ai grandement apprécié mes années dans le laboratoire Wellinger et au département de microbiologie, je veux donc remercier tous mes collègues qui ont contribué à faire de mes études une expérience très plaisante et enrichissante. Finalement, l'aboutissement de mes études est le résultat de mes efforts, mais aussi de l'immense support que j'ai toujours eu de mes proches et de ma famille, je profite donc de l'occasion pour leur exprimer ma gratitude.

Liste des références

Ancelin, K., Brun, C., et Gilson, E. (1998). Role of the telomeric DNA-binding protein TRF2 in the stability of human chromosome ends. *Bioessays* 20, 879-883.

Anderson, R. S., Bollum, F. J., et Beattie, K. L. (1999). Pyrophosphorolytic dismutation of oligodeoxy-nucleotides by terminal deoxynucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res* 27, 3190-3196.

Askree, S. H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M., et McEachern, M. J. (2004). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8658-8663.

Bailey, S. M., Cornforth, M. N., Kurimasa, A., Chen, D. J., et Goodwin, E. H. (2001). Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* 293, 2462-2465.

Basrai, M. A., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., et Hieter, P. (1999). NORF5/HUG1 is a component of the MEC1-mediated checkpoint response to DNA damage and replication arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7041-7049.

Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K., et Resnick, M. A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5613-5617.

Bertuch, A. A., et Lundblad, V. (2004). EXO1 contributes to telomere maintenance in both telomerase-proficient and telomerase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 166, 1651-1659.

Birnboim, H. C., et Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Blackburn, E. H., et Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120, 33-53.

Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G., et Fink, G. R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154, 164-175.

Boes, T., et Neuhauser, M. (2005). Normalization for Affymetrix GeneChips. *Methods Inf Med* 44, 414-417.

Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M., et Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-193.

Boule, J. B., Johnson, E., Rougeon, F., et Papanicolaou, C. (1998). High-level expression of murine terminal deoxynucleotidyl transferase in *Escherichia coli* grown at low temperature and overexpressing argU tRNA. *Mol Biotechnol* 10, 199-208.

Boule, J. B., Rougeon, F., et Papanicolaou, C. (2000). Comparison of the two murine terminal [corrected] deoxynucleotidyltransferase terminal isoforms. A 20-amino acid insertion in the highly conserved carboxyl-terminal region modifies the thermosensitivity but not the catalytic activity. *J Biol Chem* 275, 28984-28988.

Boulton, S. J., et Jackson, S. P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* 24, 4639-4648.

Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., et Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.

Brendel, M., Bonatto, D., Strauss, M., Revers, L. F., Pungartnik, C., Saffi, J., et Henriques, J. A. (2003). Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 544, 179-193.

Broomfield, S., Chow, B. L., et Xiao, W. (1998). MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5678-5683.

Brunori, M., Luciano, P., Gilson, E., et Geli, V. (2005). The telomerase cycle: normal and pathological aspects. *J Mol Med* 83, 244-257.

Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., et Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3, 1271-1274.

Bucholc, M., Park, Y., et Lustig, A. J. (2001). Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 6559-6573.

Cassier, C., et Moustacchi, E. (1981). Mutagenesis induced by mono- and bi-functional alkylating agents in yeast mutants sensitive to photo-addition of furocoumarins (psu). *Mutat Res* 84, 37-47.

Cesare, A. J., et Griffith, J. D. (2004). Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol* 24, 9948-9957.

Cesare, A. J., Groff-Vindman, C., Compton, S. A., McEachern, M. J., et Griffith, J. D. (2007). T-loops and homologous recombination dependent t-circles in a *Kluyveromyces lactis* telomere mutant strain. *Mol Cell Biol*.

Chai, W., Du, Q., Shay, J. W., et Wright, W. E. (2006a). Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol Cell* *21*, 427-435.

Chai, W., Sfeir, A. J., Hoshiyama, H., Shay, J. W., et Wright, W. E. (2006b). The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep* *7*, 225-230.

Chai, W., Shay, J. W., et Wright, W. E. (2005). Human telomeres maintain their overhang length at senescence. *Mol Cell Biol* *25*, 2158-2168.

Chakhparonian, M., Faucher, D., et Wellinger, R. J. (2005). A mutation in yeast Tel1p that causes differential effects on the DNA damage checkpoint and telomere maintenance. *Curr Genet* *48*, 310-322.

Chan, C. S., et Tye, B. K. (1983a). A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replicating sequences that have very similar genomic environments. *J Mol Biol* *168*, 505-523.

Chan, C. S., et Tye, B. K. (1983b). Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* *33*, 563-573.

Chan, S. W., et Blackburn, E. H. (2003). Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell* *11*, 1379-1387.

Chang, L. M., et Bollum, F. J. (1986). Molecular biology of terminal transferase. *CRC Crit Rev Biochem* *21*, 27-52.

Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C., et Brown, G. W. (2002). A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 16934-16939.

Chen, J. L., Blasco, M. A., et Greider, C. W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* *100*, 503-514.

Chen, Q., Ijpma, A., et Greider, C. W. (2001). Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol* *21*, 1819-1827.

Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., et Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* *110*, 119-122.

Clark-Walker, G. D., et Miklos, G. L. (1974). Localization and quantification of circular DNA in yeast. *Eur J Biochem* *41*, 359-365.

- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., et Longhese, M. P. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein negatively regulates DNA damage checkpoint signalling. *EMBO Rep* 7, 212-218.
- Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N., et Weinberg, R. A. (1997). The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9202-9207.
- d'Adda di Fagagna, F., Teo, S. H., et Jackson, S. P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 18, 1781-1799.
- da Silva, E. F., et Reha-Krantz, L. J. (2000). Dinucleotide repeat expansion catalyzed by bacteriophage T4 DNA polymerase in vitro. *J Biol Chem* 275, 31528-31535.
- Dandjinou, A. T., Levesque, N., Larose, S., Lucier, J. F., Abou Elela, S., et Wellinger, R. J. (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Curr Biol* 14, 1148-1158.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, 2100-2110.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., et Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10, 518-527.
- Demuth, I., Digweed, M., et Concannon, P. (2004). Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene* 23, 8611-8618.
- Dionne, I., et Wellinger, R. J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13902-13907.
- Dionne, I., et Wellinger, R. J. (1998). Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res* 26, 5365-5371.
- Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., et Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26, 447-450.
- Elisseeva, E., Mandal, S. S., et Reha-Krantz, L. J. (1999). Mutational and pH studies of the 3' → 5' exonuclease activity of bacteriophage T4 DNA polymerase. *J Biol Chem* 274, 25151-25158.
- Evans, S. K., et Lundblad, V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* 286, 117-120.
- Evans, S. K., et Lundblad, V. (2002). The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* 162, 1101-1115.

Evans, S. K., Sistrunk, M. L., Nugent, C. I., et Lundblad, V. (1998). Telomerase, Ku, and telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* 107, 352-358.

Fisher, T. S., Taggart, A. K., et Zakian, V. A. (2004). Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1198-1205.

Forstemann, K., Hoss, M., et Lingner, J. (2000). Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res* 28, 2690-2694.

Foster, S. S., Zubko, M. K., Guillard, S., et Lydall, D. (2006). MRX protects telomeric DNA at uncapped telomeres of budding yeast *cdc13-1* mutants. *DNA Repair (Amst)* 5, 840-851.

Gao, H., Cervantes, R. B., Mandell, E. K., Otero, J. H., et Lundblad, V. (2007). RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat Struct Mol Biol* 14, 208-214.

Garvik, B., Carson, M., et Hartwell, L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* 15, 6128-6138.

Gasch, A. P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S. J., et Brown, P. O. (2001). Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol Biol Cell* 12, 2987-3003.

Gathbonton, T., Imbesi, M., Nelson, M., Akey, J. M., Ruderfer, D. M., Kruglyak, L., Simon, J. A., et Bedalov, A. (2006). Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS Genet* 2, e35.

Gietz, R. D., et Woods, R. A. (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 313, 107-120.

Goudsouzian, L. K., Tuzon, C. T., et Zakian, V. A. (2006). *S. cerevisiae* Tel1p and Mre11p are required for normal levels of Est1p and Est2p telomere association. *Mol Cell* 24, 603-610.

Goulian, M., Lucas, Z. J., et Kornberg, A. (1968). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXV. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase induced by infection with phage T4. *J Biol Chem* 243, 627-638.

Grandin, N., et Charbonneau, M. (2007). Mrc1, a non-essential DNA replication protein, is required for telomere end protection following loss of capping by Cdc13, Yku or telomerase. *Mol Genet Genomics* 277, 685-699.

Grandin, N., Damon, C., et Charbonneau, M. (2001). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo J* 20, 1173-1183.

- Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P., et Wellinger, R. J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741-744.
- Gravel, S., et Wellinger, R. J. (2002). Maintenance of double-stranded telomeric repeats as the critical determinant for cell viability in yeast cells lacking Ku. *Mol Cell Biol* 22, 2182-2193.
- Greider, C. W., et Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., et de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Groff-Vindman, C., Cesare, A. J., Natarajan, S., Griffith, J. D., et McEachern, M. J. (2005). Recombination at long mutant telomeres produces tiny single- and double-stranded telomeric circles. *Mol Cell Biol* 25, 4406-4412.
- Guillemain, G., Ma, E., Mauger, S., Miron, S., Thai, R., Guerois, R., Ochsenbein, F., et Marsolier-Kergoat, M. C. (2007). Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 3378-3389.
- Hackett, J. A., Feldser, D. M., et Greider, C. W. (2001). Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106, 275-286.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Hayflick, L. (1984). Intracellular determinants of cell aging. *Mech Ageing Dev* 28, 177-185.
- Henderson, E. (1995). Telomere DNA structure, In *Telomeres*, E. H. Blackburn, and C. W. Greider, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 11-34.
- Henderson, E. R., et Blackburn, E. H. (1989). An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* 9, 345-348.
- Henriques, J. A., Brozmanova, J., et Brendel, M. (1997). Role of PSO genes in the repair of photoinduced interstrand cross-links and photooxidative damage in the DNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Photochem Photobiol B* 39, 185-196.
- Hockemeyer, D., Palm, W., Else, T., Daniels, J. P., Takai, K. K., Ye, J. Z., Keegan, C. E., de Lange, T., et Hammer, G. D. (2007). Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat Struct Mol Biol* 14, 754-761.

Holm, C., Meeks-Wagner, D. W., Fangman, W. L., et Botstein, D. (1986). A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene* 42, 169-173.

Huberman, J. A., Spotila, L. D., Nawotka, K. A., el-Assouli, S. M., et Davis, L. R. (1987). The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell* 51, 473-481.

Hughes, T. R., Evans, S. K., Weilbaecher, R. G., et Lundblad, V. (2000a). The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* 10, 809-812.

Hughes, T. R., Weilbaecher, R. G., Walterscheid, M., et Lundblad, V. (2000b). Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6457-6462.

Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., et Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.

Ish-Horowicz, D., et Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9, 2989-2998.

Jacob, N. K., Skopp, R., et Price, C. M. (2001). G-overhang dynamics at *Tetrahymena* telomeres. *Embo J* 20, 4299-4308.

Jelinsky, S. A., et Samson, L. D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1486-1491.

Jia, X., Weinert, T., et Lydall, D. (2004). Mec1 and Rad53 inhibit formation of single-stranded DNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* 166, 753-764.

Johnson, F. B., Marciniak, R. A., et Guarente, L. (1998). Telomeres, the nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* 10, 332-338.

Kato, K. I., Goncalves, J. M., Houts, G. E., et Bollum, F. J. (1967). Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. *J Biol Chem* 242, 2780-2789.

Keys, B., Serra, V., Saretzki, G., et Von Zglinicki, T. (2004). Telomere shortening in human fibroblasts is not dependent on the size of the telomeric-3'-overhang. *Aging Cell* 3, 103-109.

Kim, H. S., Vijayakumar, S., Reger, M., Harrison, J. C., Haber, J. E., Weil, C., et Petrini, J. H. (2008). Functional interactions between Sae2 and the Mre11 complex. *Genetics* 178, 711-723.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., et Shay, J. W. (1994). Specific

association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kyrion, G., Boakye, K. A., et Lustig, A. J. (1992). C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 5159-5173.

Labarca, C., et Paigen, K. (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102, 344-352.

Larrivee, M., LeBel, C., et Wellinger, R. J. (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* 18, 1391-1396.

Larrivee, M., et Wellinger, R. J. (2006). Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states. *Nat Cell Biol* 8, 741-747.

Lawley, P. D. (1989). Mutagens as carcinogens: development of current concepts. *Mutat Res* 213, 3-25.

Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E., et Greider, C. W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143-152.

LeBel, C., et Wellinger, R. J. (2005). Telomeres: what's new at your end? *J Cell Sci* 118, 2785-2788.

Lee, K., et Lee, S. E. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining. *Genetics* 176, 2003-2014.

Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umez, K., Kolodner, R. D., et Haber, J. E. (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* 94, 399-409.

Lee, S. E., Pellicioli, A., Malkova, A., Foiani, M., et Haber, J. E. (2001). The *Saccharomyces* recombination protein Tid1p is required for adaptation from G2/M arrest induced by a double-strand break. *Curr Biol* 11, 1053-1057.

Lee, S. E., Pellicioli, A., Vaze, M. B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M., et Haber, J. E. (2003). Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single double-strand break. *Mol Cell Biol* 23, 8913-8923.

Lehman, I. R., et Nussbaum, A. L. (1964). The Deoxyribonucleases of *Escherichia Coli*. V. on the Specificity of Exonuclease I (Phosphodiesterase). *J Biol Chem* 239, 2628-2636.

- Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M. J., et Gilson, E. (2006). The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* *16*, 1303-1310.
- Lendvay, T. S., Morris, D. K., Sah, J., Balasubramanian, B., et Lundblad, V. (1996). Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* *144*, 1399-1412.
- Lengsfeld, B. M., Rattray, A. J., Bhaskara, V., Ghirlando, R., et Paull, T. T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Mol Cell* *28*, 638-651.
- Leroy, C., Lee, S. E., Vaze, M. B., Ochsenbien, F., Guerois, R., Haber, J. E., et Marsolier-Kergoat, M. C. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* *11*, 827-835.
- Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W., et Harley, C. B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* *225*, 951-960.
- Lin, J. J., et Zakian, V. A. (1996). The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13760-13765.
- Lingner, J., Cech, T. R., Hughes, T. R., et Lundblad, V. (1997a). Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11190-11195.
- Lingner, J., Cooper, J. P., et Cech, T. R. (1995). Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* *269*, 1533-1534.
- Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., et Cech, T. R. (1997b). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* *276*, 561-567.
- Livingston, D. M. (1977). Inheritance of the 2 micrometer m DNA plasmid from *Saccharomyces*. *Genetics* *86*, 73-84.
- Lotterberger, F., Rubert, F., Baldo, V., Lucchini, G., et Longhese, M. P. (2003). Functions of *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins in response to DNA damage and to DNA replication stress. *Genetics* *165*, 1717-1732.
- Louis, E. J., et Haber, J. E. (1990). The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* *124*, 533-545.
- Louis, E. J., et Haber, J. E. (1992). The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *131*, 559-574.

- Lundblad, V., et Blackburn, E. H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347-360.
- Lundblad, V., et Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.
- Luria, S. E., et Delbruck, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28, 491-511.
- Makarov, V. L., Hirose, Y., et Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.
- Makarov, V. L., Lejnine, S., Bedoyan, J., et Langmore, J. P. (1993). Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* 73, 775-787.
- Marcand, S., Buck, S. W., Moretti, P., Gilson, E., et Shore, D. (1996). Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap 1 protein. *Genes Dev* 10, 1297-1309.
- Marcand, S., Gilson, E., et Shore, D. (1997a). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275, 986-990.
- Marcand, S., Wotton, D., Gilson, E., et Shore, D. (1997b). Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found Symp* 211, 76-93; discussion 93-103.
- Maringele, L., et Lydall, D. (2002). EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev* 16, 1919-1933.
- McElligott, R., et Wellinger, R. J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J* 16, 3705-3714.
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Mitchell, J. R., Wood, E., et Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551-555.
- Mitton-Fry, R. M., Anderson, E. M., Hughes, T. R., Lundblad, V., et Wuttke, D. S. (2002). Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* 296, 145-147.
- Moreau, S., Ferguson, J. R., et Symington, L. S. (1999). The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol* 19, 556-566.

- Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* 13, 181-195, 198.
- Munoz-Jordan, J. L., Cross, G. A., Lange, T., et Griffith, J. D. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J* 20, 579-588.
- Munro, H. N., et Fleck, A. (1966). Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. A supplementary review. *Analyst* 91, 78-88.
- Muzyczka, N., Poland, R. L., et Bessman, M. J. (1972). Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation. I. A comparison of the deoxyribonucleic acid polymerases of mutator, antimutator, and wild type strains of bacteriophage T4. *J Biol Chem* 247, 7116-7122.
- Naito, T., Matsuura, A., et Ishikawa, F. (1998). Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nat Genet* 20, 203-206.
- Nakamura, T. M., Cooper, J. P., et Cech, T. R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* 282, 493-496.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., et Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nautiyal, S., DeRisi, J. L., et Blackburn, E. H. (2002). The genome-wide expression response to telomerase deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9316-9321.
- Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F., et Lundblad, V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274, 249-252.
- O'Connor, M. S., Safari, A., Xin, H., Liu, D., et Songyang, Z. (2006). A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11874-11879.
- Ogino, H., Nakabayashi, K., Suzuki, M., Takahashi, E., Fujii, M., Suzuki, T., et Ayusawa, D. (1998). Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 223-227.
- Olovnikov, A. M. (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201, 1496-1499.
- Ono, K. (1990). Inhibitory effects of various 2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates on the utilization of 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates by

terminal deoxynucleotidyltransferase from calf thymus. *Biochim Biophys Acta* 1049, 15-20.

Osterhage, J. L., Talley, J. M., et Friedman, K. L. (2006). Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* 13, 720-728.

Parenteau, J., et Wellinger, R. J. (1999). Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27. *Mol Cell Biol* 19, 4143-4152.

Paulovich, A. G., Margulies, R. U., Garvik, B. M., et Hartwell, L. H. (1997). RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics* 145, 45-62.

Pelliccioli, A., Lee, S. E., Lucca, C., Foiani, M., et Haber, J. E. (2001). Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* 7, 293-300.

Petreaca, R. C., Chiu, H. C., Eckelhoefer, H. A., Chuang, C., Xu, L., et Nugent, C. I. (2006). Chromosome end protection plasticity revealed by Stn1p and Ten1p bypass of Cdc13p. *Nat Cell Biol* 8, 748-755.

Petreaca, R. C., Chiu, H. C., et Nugent, C. I. (2007). The Role of Stn1p in *Saccharomyces cerevisiae* Telomere Capping Can Be Separated From Its Interaction With Cdc13p. *Genetics* 177, 1459-1474.

Podlevsky, J. D., Bley, C. J., Omana, R. V., Qi, X., et Chen, J. J. (2007). The Telomerase Database. *Nucleic Acids Res.*

Polotnianka, R. M., Li, J., et Lustig, A. J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* 8, 831-834.

Prescott, J. C., et Blackburn, E. H. (2000). Telomerase RNA template mutations reveal sequence-specific requirements for the activation and repression of telomerase action at telomeres. *Mol Cell Biol* 20, 2941-2948.

Qi, H., et Zakian, V. A. (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev* 14, 1777-1788.

Reed, K. C., et Mann, D. A. (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* 13, 7207-7221.

Ritchie, K. B., Mallory, J. C., et Petes, T. D. (1999). Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 6065-6075.

Ritchie, K. B., et Petes, T. D. (2000). The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* 155, 475-479.

Rose, M. D., Winston, F. Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Roychoudhury, R., Jay, E., et Wu, R. (1976). Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res* 3, 863-877.

Rychlik, W., Spencer, W. J., et Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 6409-6412.

Sambrook, J., Fritsh, E. F., et Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B., et Elledge, S. J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271, 357-360.

Sandell, L. L., et Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.

Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M. P., Gilson, E., et Geli, V. (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat Genet* 36, 46-54.

Seto, A. G., Zaug, A. J., Sobel, S. G., Wolin, S. L., et Cech, T. R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177-180.

Shay, J. W., et Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.

Shima, H., Suzuki, M., et Shinohara, M. (2005). Isolation and characterization of novel xrs2 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 170, 71-85.

Sinclair, J. H., Stevens, B. J., Sanghavi, P., et Rabinowitz, M. (1967). Mitochondrial-satellite and circular DNA filaments in yeast. *Science* 156, 1234-1237.

Singer, M. S., et Gottschling, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Stansel, R. M., de Lange, T., et Griffith, J. D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J* 20, 5532-5540.

- Stellwagen, A. E., Haimberger, Z. W., Veatch, J. R., et Gottschling, D. E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* 17, 2384-2395.
- Stewart, S. A., Ben-Porath, I., Carey, V. J., O'Connor, B. F., Hahn, W. C., et Weinberg, R. A. (2003). Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nat Genet* 33, 492-496.
- Taggart, A. K., Teng, S. C., et Zakian, V. A. (2002). Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* 297, 1023-1026.
- Takata, H., Kanoh, Y., Gunge, N., Shirahige, K., et Matsuura, A. (2004). Reciprocal association of the budding yeast ATM-related proteins Tel1 and Mec1 with telomeres in vivo. *Mol Cell* 14, 515-522.
- Takata, H., Tanaka, Y., et Matsuura, A. (2005). Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 17, 573-583.
- Teixeira, M. T., Arneric, M., Sperisen, P., et Lingner, J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states. *Cell* 117, 323-335.
- Teng, S. C., et Zakian, V. A. (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 8083-8093.
- Ting, N. S., Yu, Y., Pohorelic, B., Lees-Miller, S. P., et Beattie, T. L. (2005). Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 33, 2090-2098.
- Toczyski, D. P., Galgoczy, D. J., et Hartwell, L. H. (1997). CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90, 1097-1106.
- Tokutake, Y., Matsumoto, T., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T., et Furuichi, Y. (1998). Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 765-772.
- Tomaska, L., Nosek, J., Makhov, A. M., Pastorakova, A., et Griffith, J. D. (2000). Extragenomic double-stranded DNA circles in yeast with linear mitochondrial genomes: potential involvement in telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* 28, 4479-4487.
- Tommerup, H., Dousmanis, A., et de Lange, T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* 14, 5777-5785.

- Trujillo, K. M., Yuan, S. S., Lee, E. Y., et Sung, P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* 273, 21447-21450.
- Tsolou, A., et Lydall, D. (2007). Mrc1 protects uncapped budding yeast telomeres from exonuclease EXO1. *DNA Repair (Amst)* 6, 1607-1617.
- Tsukamoto, Y., Taggart, A. K., et Zakian, V. A. (2001). The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol* 11, 1328-1335.
- Ulrich, H. D. (2001). The srs2 suppressor of UV sensitivity acts specifically on the RAD5- and MMS2-dependent branch of the RAD6 pathway. *Nucleic Acids Res* 29, 3487-3494.
- Usui, T., Ogawa, H., et Petrini, J. H. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* 7, 1255-1266.
- van Overbeek, M., et de Lange, T. (2006). Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* 16, 1295-1302.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., et de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vaze, M. B., Pellicioli, A., Lee, S. E., Ira, G., Liberi, G., Arbel-Eden, A., Foiani, M., et Haber, J. E. (2002). Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* 10, 373-385.
- Walmsley, R. W., Chan, C. S., Tye, B. K., et Petes, T. D. (1984). Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* 310, 157-160.
- Wang, R. C., Smogorzewska, A., et de Lange, T. (2004). Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119, 355-368.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239, 197-201.
- Weinert, T. (1998). DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Curr Opin Genet Dev* 8, 185-193.
- Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., et Zakian, V. A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85, 423-433.
- Wellinger, R. J., Wolf, A. J., et Zakian, V. A. (1993a). Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* 13, 4057-4065.
- Wellinger, R. J., Wolf, A. J., et Zakian, V. A. (1993b). *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51-60.

- Wilson, T. E., Grawunder, U., et Lieber, M. R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388, 495-498.
- Wotton, D., et Shore, D. (1997). A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 748-760.
- Wright, J. H., Gottschling, D. E., et Zakian, V. A. (1992). *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* 6, 197-210.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., et Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11, 2801-2809.
- Yang, C. P., Chen, Y. B., Meng, F. L., et Zhou, J. Q. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Est3p dimerizes in vitro and dimerization contributes to efficient telomere replication in vivo. *Nucleic Acids Res* 34, 407-416.
- Ye, J. Z., Donigian, J. R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., et de Lange, T. (2004a). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* 279, 47264-47271.
- Ye, J. Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A. N., Loayza, D., Hooper, S. M., Chait, B. T., et de Lange, T. (2004b). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* 18, 1649-1654.
- Zakian, V. A., et Scott, J. F. (1982). Construction, replication, and chromatin structure of TRP1 RI circle, a multiple-copy synthetic plasmid derived from *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA. *Mol Cell Biol* 2, 221-232.
- Zappulla, D. C., et Cech, T. R. (2004). Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10024-10029.
- Zubko, M. K., Guillard, S., et Lydall, D. (2004). Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* 168, 103-115.
- Zubko, M. K., et Lydall, D. (2006). Linear chromosome maintenance in the absence of essential telomere-capping proteins. *Nat Cell Biol* 8, 734-740.